

R-12538

T 961

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,

BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

**SINTESIS DE PROTEINAS Y ENVEJECIMIENTO:**

**PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES.**

Tesis que presenta Mohammed  
Bougria para optar al grado de  
Doctor en Biología.

Sevilla, Septiembre de 1997

CBS 1008343

**SÍNTESIS DE PROTEÍNAS Y ENVEJECIMIENTO: PAPEL  
DE LOS RADICALES LIBRES.**

***BOUGRIA MOHAMMED***

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,  
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

**SINTESIS DE PROTEINAS Y ENVEJECIMIENTO:**

**PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES.**

Tesis que presenta Mohammed Bougria para optar al grado de Doctor en Biología.

Sevilla, Septiembre de 1997

Fdo. MOHAMMED BOUGRIA

ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, CATEDRATICO NUMERARIO Y  
ANTONIO AYALA GOMEZ TITULAR DE ESCUELA UNIVERSITARIA Y JUAN  
PARRADO RUBIO CONTRATADO POSTDOCTORAL, DEL DEPARTAMENTO  
DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD  
SECRETARIA GENERAL

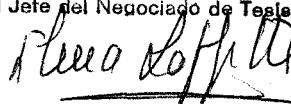
DE SEVILLA.

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio.....6..... número.....157.....del libro  
correspondiente.

Sevilla,

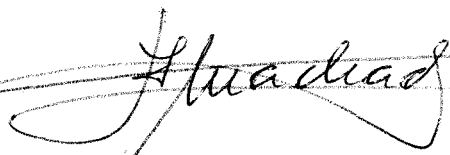
29 SET. 1997

El Jefe del Negociado de Tesis.

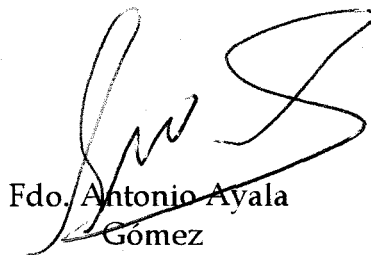


CERTIFICAN: Que la tesis doctoral titulada "**Síntesis de proteínas y  
envejecimiento: Papel de los radicales libres**", presentada por Ldo.  
MOHAMMED BOUGRIA para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido  
realizada en el departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la  
Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Sevilla, dos de  
septiembre de 1997.

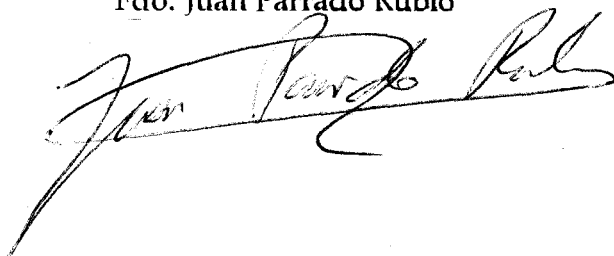


Fdo. Alberto Machado  
de la Quintana



Fdo. Antonio Ayala  
Gómez

Fdo. Juan Parrado Rubio



## Abreviaturas.

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADP	5'-difosfato de adenosina.
APS	Persulfato de amonio.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
CO	Grupos carbonilos.
DOC	Deoxicolato.
DTT	Ditiotreitol.
EDC	Clorhidrato de 1-etil-3-(3 dimetilamino-propil)carbodiimida.
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético.
EF-2	Factor de elongación 2.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
HC	Hidroperóxido de cumeno.
KLH	Hemocianina de ojo de lapa.
MDA	Malondialdehído.
NADP <sup>+</sup> , NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato y su forma reducida.
ON	Oxido nítrico.
PARP	Poli(ADP)-ribosiltransferasa.
PBN	N-ter-butyl-a-fenilnitrona.
PBS	Tampón fosfato salino "phosphate buffer saline".
PMSF	Fenilmetanosulfonilo floruro.
PPO	2,5 difenil oxazol.
RL	Radicales libres.

4

SDS	Dodecil sulfato sódico.
Sulfo-NHS	N-Hidroxisulfosuccinimida.
TBA	Ácido tiobarbitúrico.
tBHP	ter-Butil-hidroperóxido.
Tc	Constante del tiempo de terminación de la cadena péptidica.
TCA	Ácido tricloroacético.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametileno-etilenodiamina.
Tris	Tris-(Hidroximetil)-aminometano.

# ÍNDICE

ABREVIATURA.....	1
<u>1. INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>8</u>
1.1. Estés oxidativo. Definición.....	8
1.2. Definición de radicales libres (RL).....	8
1.3. Mecanismos de generación y eliminación de los radicales libres.....	10
1.3.1. Producción de especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial.....	10
1.3.2. Producción de especies reactivas de oxígeno por el sistema citocromo P-450.....	11
1.3.3. Otras fuentes de radicales libres.....	13
1.3.4. Eliminación de radicales libres.....	14
1.4. Efecto de los radicales libres sobre las biomoléculas.....	15
1.4.1. Peroxidación de lípidos.....	15
1.4.2. Oxidación del DNA.....	17
1.4.3. Oxidación de glucídos.....	17
1.4.4. Oxidación de proteínas.....	17
1.5. Proceso de envejecimiento.....	22
1.6. Síntesis proteínas y envejecimiento.....	24
1.7. Características del factor de elongación-2.....	26
1.7.1. Modificaciones post-traduccionales del factor de elongación 2.....	28
1.8. OBJETIVO DE LA TESIS.....	31

2. MATERIAL Y MÉTODOS.....33

2.1. Animales.....33

2.2. Producción de anticuerpos policlonales  
 contra EF-2 .....33

2.2.1. Péptido utilizado para la obtención de  
 anticuerpo.....33

2.2.2. Acoplamiento de péptido sintético a la proteína  
 transportadora.....34

2.2.3. Inmunización.....36

2.4. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-  
 SDS.....37

2.5. Isoelectroenfoque (IEF) y electroforesis  
 bidimensional.....39

2.6. Transferencia de proteínas a membranas de  
 nitrocelulosa y sistemas de inmunodetección por  
 Quimioluminiscencia.....41

2.7. Detección de proteínas con tinción de plata.....44

2.8. Determinación de los perfiles de poliribosoma en el  
 hígado.....46

2.9. Medida de la incorporación de aminoácidos en las  
 proteínas totales y nacientes de hígado.....47

2.10. Determinación de la radioactividad de la valina  
 específica en el hígado.....50



2.11. Determinación de malondialdehído (MDA) con ácido tiobarbitúrico (TBA).....	50
2.12. ADP-Ribosilación de EF-2.....	51
2.13. Inmunoprecipitación de EF-2 ADP-ribosilado.....	53
2.14. Determinación de la cantidad de EF-2.....	54
2.15. Determinación de grupos carbonilos de proteínas en homogeneizados de hígado.....	55
2.16. Determinación de grupos carbonilos del EF-2.....	55
2.17. Extracción y cuantificación de la nicotinamida.....	56
2.17.1. Extracción de nicotinamida .....	56
2.17.2. Cuantificación de <u>nicotinamida</u> con cromatografía de gases por espectrometría de masas (CG/MS).....	58
2.18. Medida de la concentración de proteínas.....	58
2.19. Análisis estadístico.....	58
<u>3. RESULTADOS</u> .....	58
3.1. Producción de anticuerpo monoclonal anti EF-2.....	58
3.2. Medida de los parámetros del estrés oxidativo bajo el tratamiento con HC y durante el envejecimiento.....	62
3.3. Efecto del estrés oxidativo exógeno y endógeno sobre el tiempo de terminación (Tc) de la cadena polipeptídica.....	66

3.4. Efecto estrés oxidativo exógeno y endógeno sobre la fase de iniciación de la síntesis de proteínas.....	71
3.5. Efecto estrés oxidativo exógeno y endógeno sobre la cantidad y actividad del EF-2.....	75
3.6. Efecto "in vitro" de HC sobre el EF-2 de hígado....	78
3.6. Determinación del peso molecular y el punto isoeléctrico de EF-2 durante el envejecimiento y con el tratamiento con HC.....	78
3.7. Estudio del estado de fosforilación del EF-2.....	84
3.8. Efecto del estrés oxidativo inducido exógenamente sobre la mono-ADP-ribosilación de proteínas citosólicas.	84
3.9. Efecto inhibidor de los secuestradores de RL sobre la activación de la ADP-ribosilación causada por oxidantes.....	89
3.10. Reversibilidad de la ADP-ribosilación con Ditiotreitól.....	95
3.11. Determinación de nicotinamida por cromatografía de gases unido a un detector de masas.....	95
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>97</b>
4.1. Índice de oxidación en ratas tratadas con HC y ratas viejas.....	97
4.2. Efecto del HC y el envejecimiento sobre la síntesis de proteínas.....	97

4.3. Estudio del EF-2 bajo estrés oxidativo exógeno y en el envejecimiento.....100

4.4. Estudio del EF-2 a nivel molecular bajo estrés oxidativo y envejecimiento.....105

4.5. Efecto del estrés oxidativo sobre la ADP-ribosilación de proteínas citosólicas.....106

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Estrés oxidativo. Definición.

El estrés oxidativo es un término general usado para describir el estado de daño causado por las especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas ERO, tales como los radicales libres y los peróxidos, se producen mayoritariamente en una serie de reacciones normales del metabolismo del oxígeno de los organismos aeróbicos y el daño causado por ellas puede afectar no sólo a moléculas específicas sino al organismo entero. El estado o grado de estrés oxidativo es determinado por el balance entre la velocidad en que el daño es producido y la velocidad en que el daño es eliminado. A su vez, el nivel de producción de daño viene determinado por la tasa de producción de las ERO y de inactivación de las mismas por las moléculas llamadas antioxidantes. Por otro lado, la velocidad de eliminación del daño depende del nivel de las enzimas que participan en los procesos de reparación. El estado de estrés oxidativo de cada individuo viene determinado por factores hereditarios, el entorno y el tipo de vida. Actualmente, es ampliamente aceptado, que aquellos individuos con un elevado grado de estrés oxidativo presentan una mayor probabilidad de sufrir de forma más temprana las denominadas enfermedades relacionadas con la edad.

### 1.2. Definición del Radical libre (RL).

Los radicales libres se pueden definir como toda especie molecular que tiene uno o más electrones desapareados, cuya enorme reactividad se debe a la inestabilidad de su configuración electrónica, tendiendo siempre a captar de otras moléculas el electrón que les falta para alcanzar la estabilidad. Aunque esta definición incluye al átomo de hidrógeno (un electrón desapareado), a la mayoría de los metales de transición y los derivados del oxígeno, la definición de los radicales libres está a veces acompañada de la especificación de que el electrón está situado en el exterior del orbital. Esta última definición excluye la mayoría de los metales de transición. Sin embargo, vista la importancia de estos metales en las reacciones de transferencia de electrones (Hill, 1981; Halliwell, 1987; Halliwell, 1989), se suele preferir la definición más simple.

Los radicales libres derivados del oxígeno, en particular el anión superóxido  $O_2^{\cdot -}$ , se producen de manera constante en el organismo (Yu y Yang, 1996) (p.ej. un individuo que tiene una vida media de 80 años, consume cerca de 80 toneladas de oxígeno y produce 350 Kg de especies reactivas de oxígeno, un 1-10% del oxígeno total). Aunque los radicales libres pueden tener algunos efectos beneficiosos, como, por ejemplo, poder bactericida, las especies reactivas de oxígeno son altamente perjudiciales a nivel celular y molecular y su extremada reactividad hace que ocasionen importantes alteraciones moleculares (Levine y col,

1981; Keherer, 1993). De aquí que la supervivencia de los organismos dependa de la prevención y reparación de los daños oxidativos. En este sentido, juegan un papel importante los sistemas antioxidantes (enzimas y moléculas captadoras de radicales libres que protegen de los daños producidos por estos radicales).

### 1.3. Mecanismos de generación y eliminación de los radicales libres.

Nuestro organismo posee diferentes mecanismos de formación y eliminación de los radicales libres, entre los más importantes productores de radicales libres se puede destacar:

#### 1.3.1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) a nivel mitocondrial.

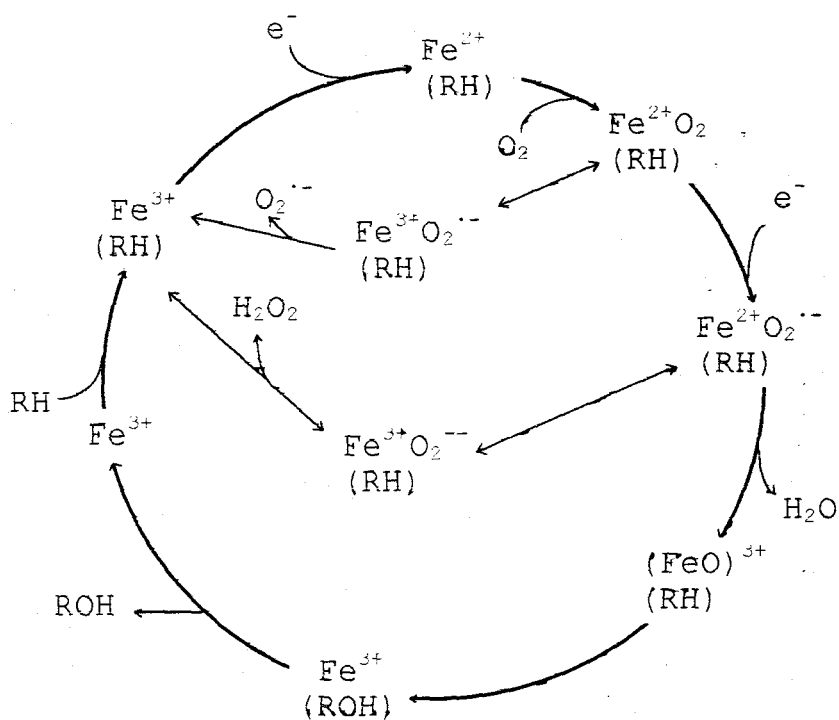
En condiciones aeróbicas, la cadena respiratoria representa la mayor fuente de radicales libres en la célula (Boveris Y Chance, 1973; Jobsis y LaManna, 1978). Se ha descrito que la inhibición (52% de inhibición de la actividad de NADH-ubiquinona-1 (CoQ<sub>1</sub>) reductasa) con el MPP<sup>+</sup> del complejo I o la inhibición con antimicina A del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial están acompañados por la liberación de radicales libres (Turrens y Boveris, 1980; Hasegawa y col, 1990). La producción de radicales superóxidos por la cadena respiratoria está implicada en varios procesos patológicos, particularmente

en el envejecimiento, las enfermedades degenerativas y el cáncer (Sohal y Dubey, 1994; Shigenaga y col, 1994; Ames y col, 1995; Ames y col, 1993; Cortopassi y Wang, 1995; Wang y cortopassi, 1994; Cortopassi y Arnheim, 1990). Otros autores han descrito que los radicales libres no se presentan como la causa inmediata del proceso de envejecimiento, y lo relacionan con la disminución de los secuestradores de los radicales libres (Forman y Azzi, 1997).

### 1.3.2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por el sistema citocromo P-450.

Los mamíferos presentan un sistema de detoxificación situado en el retículo endoplásmico de las células hepáticas por el que las toxinas son primeramente oxidadas por el citocromo P-450 y transformadas, después, en una forma soluble (Ochi, 1995).

Aunque, el sistema citocromo P-450 es un componente importante de los mecanismos de defensa que protegen a los organismos de las sustancias toxicas, es al mismo tiempo una fuente importante de radicales libres (**Fig. 1**) y sustancias carcinogénicas, a veces generadas a partir de compuestos no toxicos (Ocih, 1995).

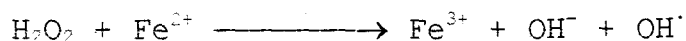


**Figura. 1.** Reacción de oxidación de toxinas por el sistema citocromo P-450 y los niveles de producción de los radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ). El sustrato está representado por (RH) y su correspondiente producto por (ROH). El hierro del hemo de citocromo P450 es representado por  $Fe^{3+}$  (Moorhouse y Aust, 1988)

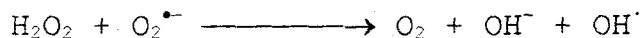


### 1.3.3. Otras fuentes de radicales libres.

Otro de los procesos importantes de producción de radicales libres (radical hidróxilo) es la reducción del agua oxigenada por ciertos iones metálicos, en una reacción llamada **Reacción de Fenton**.



También, por la reacción de Haber-Weiss, puede producirse el radical hidróxilo a partir del superóxido y del agua oxigenada, siendo dichas reacciones catalizadas por hierro (en forma de sal ferroso).



Además de estas dos importantes fuentes de RL, existen otras fuentes secundarias:

#### 1. A partir de actividades enzimáticas:

triptófano dioxigenasa

indolamina dioxigenasa

xantina oxidasa

peroxidasa (durante la oxidación de NADH)

aldehído oxidasa

#### 2. A partir de moléculas pequeñas:

riboflavina reducida, FMNH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>

difenol (adrenalina)

melanina

tioles

#### 1.3.4. Eliminación de radicales libres.

El organismo presenta varios mecanismos de protección contra las especies reactivas de oxígeno. Los más importantes son:

##### **1. sistemas no enzimáticos:**

α-tocoferol

ascorbato

β-carotenos

urato

ceruloplasmina

##### **2. Sistemas enzimáticos:**

superóxido dismutasa

glutation peroxidasa

catalasa

##### **3. Sistemas de enzimas auxiliares:**

NADPH-quinona oxidoreductasa

epóxido hidrolasa

UDP-glucoroniltransferasa

sulfotransferasa

GSH-S-transferasa

GSSG-reductasa

glucosa-6-fosfato dehidrogenasa

#### 1.4. Efecto de los radicales libres sobre las biomoléculas.

Como ya se ha mencionado, el estrés oxidativo es un término general usado para describir el daño causado por las especies reactivas de oxígeno. Este daño puede afectar a moléculas específicas o al organismo entero. Los daños oxidativos causan alteraciones en las funciones normales del organismo y pueden generar muchas enfermedades específicas. El daño de los radicales se inicia, a menudo, a nivel de las membranas plasmáticas deteriorando la permeabilidad de la membrana a los iones y afectando ciertas proteínas transmembranarias como transportadores y enzimas (Halliwell y Gutteridge, 1989; Benedetti y col, 1988). Este efecto es un factor importante en el deterioro de las funciones óptimas del organismo que conducen al envejecimiento (Kowalds y Kirkwood, 1994).

Los radicales libres, debidos a su alta reactividad, pueden alterar distintas biomoléculas.

##### 1.4.1. Peroxidación de lípidos.

La peroxidación de lípidos a nivel de la membrana biológica altera la fluidez, el potencial transmembranario, la

Esta reacción, no sólo afecta a las membranas y los ácidos grasos, sino también altera los lípidos alimentarios (O'Connell y Garner, 1983).

#### 1.4.2. Oxidación del DNA.

Se ha descrito que cuando las células están expuestas a un estrés oxidativo (por ejemplo, un aumento intracelular de compuestos como  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , por tratamiento exterior con concentraciones altas de  $H_2O_2$ , o una exposición al humo del tabaco) se producen roturas en las hebras del DNA (Mello Filho y col, 1984; Mello Filho y Meneghini, 1984; Imlay y Linn, 1988; Nakayama y col, 1985; Birnboim, 1988), deleciones cromosómicas y alteraciones en la expresión genética que pueden llevar a la muerte celular (Freeman y Crapo, 1982; Richter y col., 1988). El DNA mitocondrial también se encuentra afectado (Cutler, 1991).

#### 1.4.3. Oxidación de glúcidos.

Los radicales libres también actúan sobre los glúcidos, produciéndose alteraciones como despolimerización y la fragmentación del ácido hialurónico componente importante de la sustancia básica del fluido sinovial y del humor vítreo del ojo (Dunn y col., 1991).

#### 1.4.4. Oxidación de proteínas.

En general, el origen de la formación de una proteína defectuosa (dañada o anormal) puede ser iniciado por varios

medios distintos de las oxidaciones por RL. Así, algunas proteínas anormales son producto de errores a nivel de la síntesis de proteínas (ARNm anormal o incorporación incorrecta de aminoácidos o anormales). Otras, son productos de un plegamiento incorrecto o son proteínas desnaturalizadas. Toda esta gama de proteínas erróneas, son rápidamente degradadas "in vitro".

Por otro lado, se han descrito numerosas modificaciones químicas que se producen en las proteínas con posterioridad a su síntesis. Entre las modificaciones post-traduccionales que parecen tener mayor repercusión sobre las actividades de las proteínas, las más importantes son la oxidación y la glicosilación. Los trabajos llevados a cabo por el grupo de Stadman (Stadman, 1985; Stadman, 1986; Stadman, 1993) y otros (Davies, 1985; Levine, 1983; Roseman y Levine 1987; Cervera y Levine 1988) nosotros y estos (Gordillo y col, 1988; Gordillo y col, 1989; Davies, 1986; Davies y Goldberg, 1987a; Davies y Goldberg, 1987b; Davies, 1987; Davies y col, 1987; Davies y Delsignore, 1987; Davies y col, 1987; Taylor y Davies, 1987; Davies y Lin, 1988; ; Davies y Lin, 1988; Marcillat y col, 1988) ponen de manifiesto el efecto inactivador que produce una gran variedad de sistemas oxidativos sobre muchas enzimas. En estos estudios, también se ha observado que la inactivación de enzimas por oxidación activa la degradación proteolítica de las mismas. La degradación de numerosas proteínas implica, generalmente, dos

pasos (Cervera y Levine, 1988; Pacifici y col, 1989). En el primero, la enzima es oxidada dando lugar a una forma catalíticamente inactiva. En esta etapa se oxidan aminoácidos por la acción combinada de hierro y de agua oxigenada, dando lugar a derivados carbonílicos. En el segundo paso, la forma oxidada es degradada rápidamente por una serie de proteasas intracelulares (Fig. 2). Así, se ha comprobado que la inactivación de la glutamina sintetasa de *E. coli* esta producida por conversión de la His<sub>269</sub> en Asn (Farber y Levine, 1986) y de la Arg<sub>344</sub> en un derivado del semialdehído glutámico (Climent y Levine, 1991). Estos dos residuos están implicados en los sitios de unión del metal al centro catalítico de la enzima (Almassy y col., 1986). La susceptibilidad de la enzima al siguiente paso de degradación por proteasas, está asociada con la modificación de un segundo residuo de His, el cual está situado en el segundo sitio de unión del metal a la enzima (Almassy y col., 1986; Levine, 1983).

Al final de los años ochenta, se desarrolló una técnica para determinar los grupos carbonilos, un subproducto que se forma por la oxidación de las proteínas. Estas determinaciones revelaron que la cantidad de proteínas oxidadas en diversos tipos celulares del organismo humano aumentaban exponencialmente con la edad del donante (Lenz, 1989). También, se han obtenido resultados interesantes al examinar fibroblastos procedentes de pacientes con Projeria y el síndrome de Werner (Oliver y col,

1987), en las que se produce un envejecimiento prematuro. Estas personas presentan niveles de grupos carbonilos extraordinariamente más elevados que los individuos normales de su misma edad. Según algunos cálculos, hasta la mitad de las proteínas, de una persona de edad avanzada podrían quedar inactivas a causa de las alteraciones oxidativas (Lissi y col, 1991). Este grado de oxidación, conduciría casi con certeza a la senescencia.

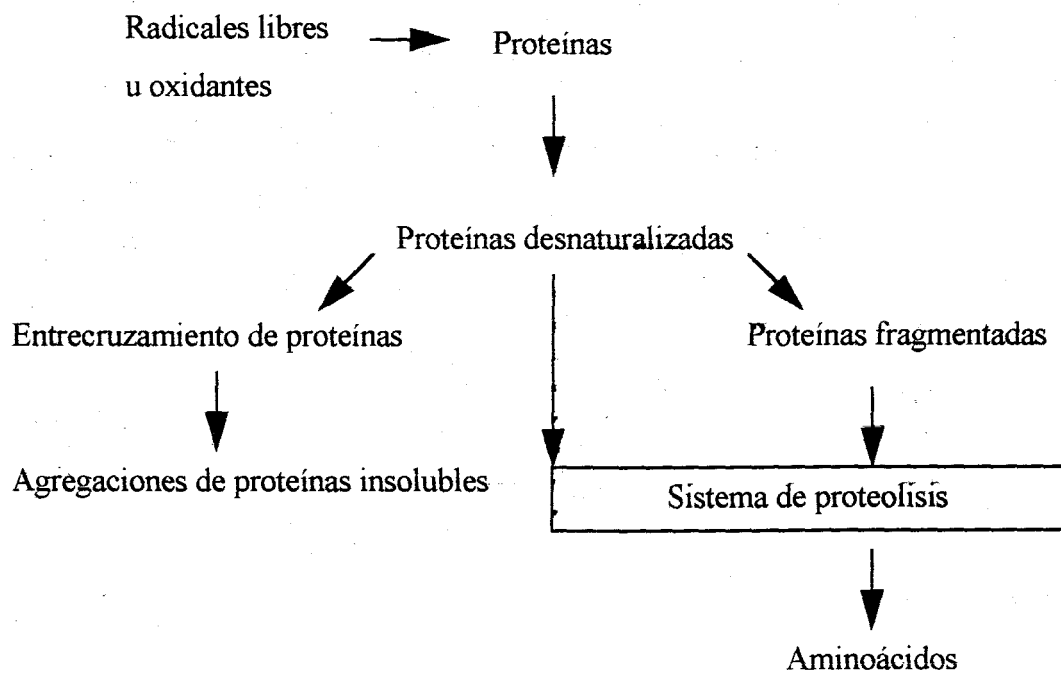


Fig. 2. Efecto de los radicales libres sobre las proteínas.



### 1.5. Proceso de envejecimiento.

Se puede definir el proceso de envejecimiento como la acumulación de cambios y alteraciones que se producen con la edad, asociado a una disminución lineal y constante de la capacidad de las funciones biológicas (Cutler, 1984).

Aunque son muchas las hipótesis que a lo largo de estos años han intentado establecer las causas del envejecimiento, ninguna de ellas es capaz de explicar en su totalidad el mecanismo de los cambios moleculares fenotípicos y genotípicos asociados con la edad y la mayoría de las teorías se han limitado a describir fenómenos o definir cambios fenotípicos que suceden durante el ciclo de vida de los organismos (**Tabla. 1**). Algunas de estas hipótesis no sólo han intentado explicar el mecanismo por el cual envejecen los organismos, sino también los cambios evolutivos que conlleva la longevidad, así como las distintas velocidades con las que las diferentes especies envejecen (Cutler, 1984).

Entre todas estas teorías, **la teoría de los radicales libres y envejecimiento** de Harman(1956) es la más aceptada, no solamente en el área de Gerontología, sino en varias disciplinas biológicas.

Tabla 1.

## TEORIAS SOBRE EL ENVEJECIMIENTO Y LONGEVIDAD.

Teoría de la Pleitropía Antagonista	Williams, 1957.
Teoría de las mutaciones somáticas	Orgel, 1963. Curtis, 1963,1966.
Teoría del Soma Desechable	Kirkwood, 1988.
Teoría de los radicales libres	Harman, 1956, 1968. Stadtman, 1992. Sohal and Weindruch,1996.
Teoría de la disdiferenciación	Cutler, 1982.
Envejecimiento y capacidad proliferativa celular. Telómeros.	Harley y col., 1990, 1995.

La teoría de los radicales libres ha permitido explicar la interacción entre envejecimiento y el desarrollo de enfermedades relacionadas y los cambios funcionales y estructurales que ocurren durante este proceso. Esta teoría fue propuesta por Harman en 1956, y fue conocida en aquella época como "*la hipótesis de la biología de las radiaciones y los radicales libres*" Posteriormente, se comprobó

que los rayos X producían radicales libres y aceleraban el proceso de envejecimiento.

#### 1.6. Síntesis proteínas y envejecimiento.

Una de las observaciones válida para todos los organismos es la disminución considerable de la capacidad de síntesis de proteínas con el envejecimiento (Richardson, 1981; Makrides, 1983). Así, se ha descrito una disminución de la síntesis de proteínas con la edad en diferentes órganos de ratón, incluyendo el hígado (Mainwaring, 1969; Blazejowski, 1983), el músculo esquelético (Blazejowski, 1983; Britton, 1975), los riñones (Blazejowski, 1983), el cerebro (Blazejowski, 1983) y el timo (Azelis y col, 1982). Además, la naturaleza de esta disminución es diferente en cada órgano (Blazejowski, 1983). El efecto del envejecimiento sobre las diferentes etapas de la síntesis de proteínas también ha sido establecido en *Drosophila melanogaster*. Estudiando la unión del metionil-tRNA al complejo de iniciación 40S y la formación del complejo de iniciación 80S, se observó una disminución del 12-20% en *Drosophila* "vieja". Estudios similares realizados en extractos celulares de hígado y riñón de ratas jóvenes y viejas (Gabiussy col, 1983) y ratones (Blazejowski y Webster, 1984), revelaron cambios parecidos con la edad. Estos estudios se han centrado en los factores de iniciación. Así, se ha descrito, tras el nacimiento de ratas de tres meses, el factor de iniciación eIF-2 sufre una

disminución en su actividad en cerebro (Vargas y Castañada, 1983; Calés y col, 1986).

Además de estos factores de iniciación, los factores de elongación han sido muy estudiados, sobre todo los factores de elongación EF-1 y EF-2. Usando como modelo experimental *Drosophila*, nematodos y roedores y determinando la unión de la fenilalanil-tRNA al ribosoma en la traducción de un RNAm poli(U) de un extracto celular, se ha demostrado que la fase de elongación de la síntesis de proteínas sufre una bajada significativa (Webster, 1985, 1986; Richardson y Semsei, 1987). En cuanto a las características del EF-1, este factor está constituido por dos partes: una proteína de unión de nucleótidos, EF-1 $\alpha$ , y un complejo de proteínas de intercambio de nucleótido, EF-1 $\beta\gamma$  (Riis y col, 1990). Aún no se han realizado estudios sobre los cambios del factor EF-1 $\beta\gamma$  relacionados con la edad. No obstante, el EF-1 $\alpha$  ha sido bastante estudiado. Por ejemplo, Cavallius y col. (1986) ha observado en extractos celulares y usando ensayos estoquiométricos y catalíticos, una disminución del 45% en la cantidad de EF-1 $\alpha$  activo y un 35% de la actividad catalítica de este factor en el envejecimiento de los fibroblastos humanos, MRC-5. Una bajada similar de la cantidad y la actividad del EF-1 $\alpha$  fue determinada a partir de ratones viejos e hígado de ratas (Rattan y col, 1987). No obstante, no se detectó ninguna diferencia en la cantidad y actividad del EF-1 $\alpha$  en hígado de ratas viejas (Fischer 344), alimentada con dieta pobre en calorías respecto a ratas

controles, a pesar de la diferencia observada en la tasa de síntesis de proteínas totales (Rattan, col, 1991). Otro factor es el EF-2, responsable de la translocación del peptidil-tRNA en el ribosoma. Se han publicado varios resultados contradictorios sobre los cambios relacionados con la edad de la cantidad y la actividad del EF-2. Así, Webster (1985), no detectó ninguna diferencia en la actividad de EF-2 en extractos celulares de *Drosophila* de diferentes edades y en órganos de roedores. En trabajos similares, la proporción de EF-2 termosensible aumenta con la edad y la actividad específica de este factor no cambia entre ratones jóvenes y viejos (Takahashi y col, 1985b). Sin embargo, se ha descrito en los fibroblastos humanos MRC-5 (Riis y col, 1990), una disminución del 64% en la cantidad de EF-2 activo determinado indirectamente por el ensayo de la toxina difterica.

Considerando los resultados relacionados al efecto de los oxidantes sobre la síntesis de proteínas (ver más adelante), nuestro estudio se ha centrado en el EF-2.

### 1.7. Características del factor de elongación-2.

El eEF-2, es una cadena polipeptídica que contiene 857 aminoácidos en los eucariontes superiores, con una diferencia de solamente 8 aminoácidos entre el hamster y el humano (Rapp y col, 1989). Su peso molecular relativo es de 95-100 kDa y tiene pI de alrededor de 7. Contiene 18 grupos disulfidrilos. Esta enzima

cataliza la translocación del peptidil-tRNA desde el sitio A al sitio P del ribosoma. El EF-2 es también un miembro de la familia de proteínas ligantes de nucleótidos de guanina y contiene la secuencia correspondiente a esta proteína descrita por (Dever y Merrick, 1989). El enlace que se establece entre el factor EF-2 y el GTP produce una transformación en la conformación de la enzima, aumentando de este modo su afinidad por los ribosomas (Nilsson and Nygård, 1985; Sontag y col, 1993). La acción del factor de elongación 2 depende del complejo ternario EF-2, GTP y ribosoma. Durante su acción catalítica, el EF-2 hidroliza una molécula de GTP dando un GDP y Pi. La enzima tiene una afinidad 5 veces más alta al GDP que el GTP (Kd: 2.5  $\mu\text{M}$  y 0.5 $\mu\text{M}$ , respectivamente). In vivo esta diferencia de afinidad está compensada por la alta concentración de GTP citosólica.

El EF-2 presenta una homología en la secuencia de aminoácidos con la ciclofilina (Gschwendt y col, 1988). La ciclofilina presenta la actividad peptidil-prolilo cis-trans isomerasa, reacción que se considera como un factor limitante en el proceso de plegamiento de algunas proteínas (Fischer y col, 1989). Esto conllevó que algunos autores especulasen con la posibilidad de una segunda función de este factor como una enzima cis-trans isomerasa, lo que no se ha demostrado todavía.

### 1.7.1. Modificaciones post-traduccionales del factor de elongación

#### 2.

Se han descrito al menos tres modificaciones post-traduccionales en el EF-2. Normalmente, el EF-2 contiene una histidina en posición 715 en el caso de los eucariontes superiores que esta modificada en 2-[3-carboxiamido-3-(trimetil-amonio)propil] histidina(diftamida) (Van Ness y col, 1980). La diftamida y los aminoácidos de alrededor están muy conservados en todos los organismos, incluido las arqueobacterias, (Los mutantes carentes de diftamida, presentan una síntesis de proteínas normal y son resistentes a la inactivación por toxina difterica), la presencia de diftamida podría estar implicada en algún proceso de regulación o de interacción con los ribosomas. La segunda modificación post-traducciona es la ADP-ribosilación de la diftamida, cuya consecuencia es la inactivación del EF-2 y la inhibición de la síntesis de proteínas. Existen dos formas de ADP-ribosilación, una ADP-ribosilación endógena, producida por las ADP-ribosiltransferasas celulares (Sitikov y col, 1984; Fendrick y Iglewski, 1989) y otra exógena producida al menos, por dos toxina bacterianas, la toxina difterica, sintetizada por *Corynebacterium diphtheriae* infectado por el fago  $\beta$ , y la exotoxina de pseudomonas, producida por *Pseudomonas aeruginosa* (Lee y Iglewski, 1984). La tercera modificación post-traducciona detectada en el EF-2 es la fosforilación (End y col, 1982; Palfrey y col, 1983). La fosforilación inactiva al EF-2 e inhibe la síntesis de proteínas (Riis y col, 1990; Donovan y Bodley, 1991), Esta modificación afecta un residuo de treonina situado cerca del extremo N-terminal entre los aminoácidos 51 y 60 en el dominio

ligante del GTP. En el caso de los mamíferos, esta zona contiene tres treoninas en las posiciones 53, 56 y 58 pero en la levadura hay solo dos (Perentesis y col, 1992). Estudios funcionales utilizando un purificado de EF-2 fosforilado, mostraron que la fosforilación de solo una treonina inhibe totalmente la actividad del factor de elongación (Carlberg y col, 1990), Trabajos recientes demuestran que la fosforilación del EF-2 puede afectar a otros residuos además de la treonina, como la serina y la tirosina (Kim y col, 1991; Brown y col, 1994). Entre las enzimas responsables de la fosforilación endógena se ha identificado a las proteínas quinasas dependientes de  $\text{Ca}^+$ -Calmodulina (CaM PK III), llamadas también las quinasas de EF-2 (Nairn y Palfrey, 1987). La inactivación del EF-2 por fosforilación, al contrario que la ADP-ribosilación, es un mecanismo reversible catalizado por una fosfatasa, PP2A (Gschwendt y col, 1989). Se ha descrito otro tipo de fosfatasa, PP2C, que defosforila también el EF-2, pero no está activa en todos los tejidos (Redpath y Proud, 1990). Algunos hongos y levaduras simples contienen un tercer factor de elongación soluble, EF-3. Esta constituido de una cadena péptidica de 125 kDa aproximadamente, situado en la pequeña subunidad ribosomal en las levadura (Kamath y Chakraborty, 1989). Esta descrito que el EF-3 constituye una parte interna del ribosoma en los eucariotas, y la adición de este factor a un extracto no influye en el desarrollo de la síntesis de proteínas. Sin embargo, la extracción o la inhibición de este factor en los hongos o levaduras inferiores bloquea totalmente la síntesis de proteínas.



### 1.8. OBJETIVO DE ESTA TESIS.

El principal objetivo de este trabajo es estudiar el mecanismo por el cual la síntesis de proteínas disminuye durante el envejecimiento.

Como se indica en la introducción, durante el proceso del envejecimiento se produce una disminución significativa de la síntesis de proteínas en todos los órganos de los distintos organismos estudiados. Sin embargo, hasta el momento no se sabe qué etapa de la síntesis de proteínas se encuentra especialmente afectado. Durante un cierto tiempo se consideraba que la disminución de la actividad de síntesis de proteínas podría ser debida a la disminución de la concentración del factor de iniciación. Estos trabajos fueron desarrollados en *Drosophila*, observándose que el aumento de la dotación genética del gen del factor de iniciación 1 producía un aumento significativo de la longevidad. Aunque este fue un descubrimiento importante, posteriormente se describió que el aumento de la longevidad era debido al lugar de unión del gen en el genoma de *Drosophila* e independiente del gen implantado. Esto estudios previos nos llevaron a estudiar el mecanismo por el cual la síntesis de proteínas disminuye durante el envejecimiento, para ello, hemos usado una técnica de medida de la actividad de síntesis de proteínas "in vivo", que permite distinguir el efecto sobre las distintas fases del proceso. Considerando la principal teoría del envejecimiento, que lo relaciona con el acúmulo del daño oxidativo.

Se han estudiado las similitudes entre los cambios en la síntesis de proteínas de los animales jóvenes tratados con compuestos oxidantes y animales viejos.

La primera fase del trabajo ha consistido en demostrar que la inhibición de la síntesis de proteínas se producía "in vivo" con la administración del oxidante elegido o durante el envejecimiento (En este último caso, se trataba de confirmar algo que ya ha sido previamente descrito). A continuación, se determinó qué fase de este proceso resulta más afectada. Una vez finalizada esta parte se decidió qué factor o factores de la fase afectada podrían ser los mejores candidatos para ser modificados. Por último, se estudiaron las modificaciones en estos factores durante el envejecimiento y en el estrés oxidativo, que pudieran dar cuenta de la inhibición encontrada.

## 2. Material y Métodos.

### 2.1. Animales.

Hemos utilizado en nuestros experimentos ratas hembras de 3, 12 y 24 meses de raza Wistar con un peso medio de 200 gramos. Las ratas fueron criadas en nuestro centro y mantenidas en condiciones controladas de luz y temperatura, con agua y alimentos "ad libitum". Las ratas tratadas con hidroperóxido de cumeno (Sigma) recibieron inyecciones intraperitoneales (IP, 35 mg/Kg de peso/día) a las 10 a.m durante 7 días. Las ratas controles se trataron con 0.9% NaCl. El peso de las ratas fue controlado a lo largo del tratamiento fue similar en todos los grupos.

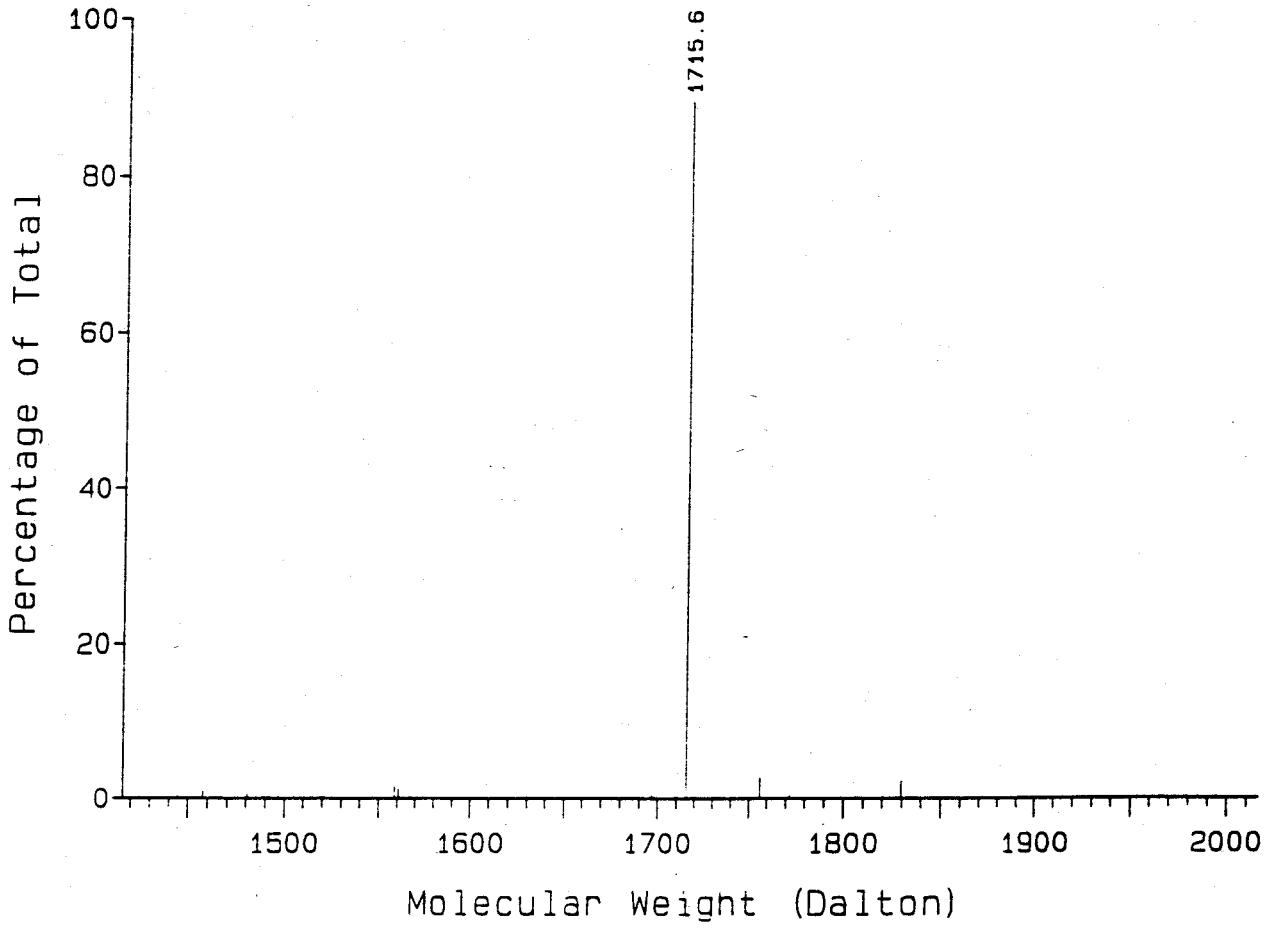
### 2.2. Producción de anti-cuerpos policlonales anti EF-2.

#### 2.2.1. Péptido utilizado para la producción de anticuerpo.

Para preparar el anticuerpo policlonal anti EF-2 se usó el péptido sintético H-CGTRFTDTRKDEQGC-NH<sub>2</sub>, de peso molecular 1715.9 dalton, que corresponde a una zona de la cadena polipéptidica del EF-2 de máxima hidrofilia (En negrita). El péptido fue sintetizado por Chiron Mimotopes peptide systems (Australia).

La pureza del péptido se verificó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando para ello columnas de fase reversa tipo (Hibar, Merck, LiChosphere 100RP-18, ODS, tamaño de partícula: 5 µm, Largo: 25 cm, Diametro interior: 4 mm.).

H-CGTRFTDTRKDEQGC-NH2



Condiciones de analisis con HPLC:

- Disolvente A: 0.1% TFA (Acido trifluoroacetico) en agua desionizada (MilliQ).
- Disolvente B: 60% Acetonitrilo, 0,1% TFA en agua desionizada (MilliQ).
- Gradiente: 100% disolvente A al 100% disolvente B a partir de 5-20 min. Flujo 1,5 ml/min.
- Temperatura de la columna: 25°C.

### 2.2.2. Acoplamiento de péptido sintético a la proteína transportadora.

Con el fin de aumentar su capacidad inmunogénica, el péptido se unió a la proteína transportadora hemocianina de ojo de lapa (Harlow y cols, 1988) usando el test comercializado por Pierce. La reacción de acoplamiento se realizó con carbodiimida (EDC, Pierce) mediante el siguiente procedimiento:

1. El péptido se disovio en PBS (2 mg/ml), en una solución, 140 mM NaCl, 8.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5 (PBS).
2. Se añadió EDC hasta una concentración final de 50 mM y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente ajustando el pH entre 7 y 7.5 con NaOH.
3. Se añadió un volumen igual (péptido + EDC) de KLH y fue incubado 2 horas con agitación suave a temperatura ambiente.
4. Se paró la reacción añadiendo acetato sódico pH 4.2 hasta una concentración final de 100 mM.

5. El péptido que no habia reaccionado fue eliminado por diálisis frente a PBS durante 12 horas a 4°C.

6. El péptido unido a la KLH se fraccionó y se congeló a -20°C hasta su utilización.

### 2.2.3. Inmunización.

Los conejos fueron inmunizados con el péptido acoplado a KLH. Se utilizaron 300-400 mg de antígeno por inoculación. En la primera inoculación los conejos fueron inyectados subcutáneamente a lo largo de la columna vertebral (10 pinchazos), con el antígeno emulsionado por sonicación en adyuvante completo de Freund (1:1, v/v).

Posteriormente, se realizaron 3 inoculaciones subcutáneas más, a intervalos de 2 semanas en adyuvante incompleto de Freund (1:1, v/v). Los animales fueron sangrados antes de la primera inyección (muestras preinmunes) y 10 días después de cada inoculación.

### 2.4. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS, se realizaron según el método descrito por Laemmli (1.970). Para la preparación de los geles se utilizaron las siguientes soluciones de partida:

Las muestras se mezclan en proporción 1:1 con el tampón de muestra, cuya composición se detalla a continuación, y posteriormente hervidas a 100 °C durante 5 min.

0.01 M Tris/HCl pH 6.8

20% glicerol

10% b-Mercaptoetanol

2.3% SDS

0.005% Azul de Bromofenol

Agua destilada llevar hasta 50 ml.

Como tampón de corrido se empleó una solución cuya composición fue: 0.05 M Tris, 0.383 M glicina pH 8.3 y 0.1% SDS.

En cuanto a las condiciones de las electroforesis, éstas se llevaron a cabo a 75 V mientras la muestra corría dentro del gel espaciador y a 150 V hasta que el frente llegó a 1 cm del final del gel separador. Los geles, una vez finalizadas las electroforesis, se tiñeron durante 30 min. con azul de Coomasie G al 0.25% (p/v) en etanol: agua: acético (5:5:1), tras lo cual se destiñeron con una solución que contenía ácido acético glacial al 7.5% y metanol al 5%.

## 2.5. Isoelectroenfoque (IEF) y electroforesis bidimensional.

Primera dimensión:

El isoelectroenfoque se realizo según el procedimineto de Nicholas y Redpath (1991). La solución de acrilamida contenía 9 M urea (p/v), 4.8% acrilamida (p/v), 0.2% bis-acrilamida (p/v) y 4% anfolitos (p/v), pH 6-8. Después de degasificar, se añadieron CHAPS solido hasta una concentración de 2%, 50 µl de persulfato de amonio al 10% y 6 µl de tetrametiletildiamina (TEMED). La solución se dejó polimerizando durante toda la noche a 4°C. Los tampones del cátodo y el ánodo fueron 20 mM NaOH y 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, respectivamente. La cantidad de muestra cargada en cada pocillo fue 10-150 µg de proteínas, y en un volumen total de 20 µl. Las muestras fueron preparadas en un tampón de muestra de composición 8 M Urea, 2% Triton X-100, 1% 2-mercaptoetanol, 1% Azul de bromofenol y 2.4% de anfolitos pH 6-8. El IEF se corrió a potencia de 4 Watios, con un límite de voltage de 1.000 V. Tras 2 horas, se cambió el limite a 650 V. A continuación, los geles se transferieron a una membrana de nitrocelulosa (Blotting) o se tiñieron. Para la tinción del gel se lavó toda la noche con 10% TCA (para eliminar CHAPS y los anfolitos) tras lo cual se lavó con agua y posteriormente teñido durante 15 min. con azul de Coomasie G al 0.25% (p/v) en etanol: agua: acético (5: 5: 1). El gel se destiño con una solución que contenía ácido acético glacial al 7.5% y metanol al 5%.

Segunda dimensión:



Una vez terminada la primera dimensión, el gel se cortó en tiras correspondiendo a los distintos pocillos, las cuales fueron congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para proceder a su corrido en la 2D se equilibran las tiras en tampón (para la eliminación de los anfolitos y a la desnaturalización de las proteínas separadas por el pI) de equilibrio durante 2 minutos y a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tampón de equilibrio.

Tris base	0.3 M
Tris/HCl	0.075 M
SDS	3%

A 100 ml de este tampón se le añade

DTT	50 mM
Azul de Bromophenol	0.01%

La agarosa se preparó al 0.5% (p/v) en tampón de corrido 0.025 M Tris\HCl pH 8.3, 0.192 M Glicina y 0.1% SDS. Se añadió 0.001% del Azul de Bromofenol y se calentó en un baño de agua hirviendo. Después de fundir la agarosa se enfrió hasta  $50^{\circ}\text{C}$ .

Se preparó un gel según se describe en el apartado 2.4, dejando un espacio entre el gel espaciador y el borde superior para insertar la tira del IEF.

Una vez insertada la tira se coloca la agarosa fundida encima y se deja endurecer a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 10 minutos el gel esta preparado para su corrido

en la segunda dimensión bajo las mismas condiciones descritas en el apartado 2.4..

## 2.6. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y sistemas de inmunodetección por Quimioluminiscencia.

A- Tras la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS o tras el isoelectroenfoque, se procedió a la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (0.45 mm de  $\phi$ ). La transferencia se realizó según el método descrito por Towbin (1979) durante toda la noche, a 4 °C y 30 Voltios.

Preparación del tampón:

El tampón de transferencia contenía 25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glicina, 20% metanol y 0.05-0.1% SDS.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Se cortó la membrana y el papel filtro según las dimensiones del gel y se sumergieron en el tampón de transferencia durante 15 minutos.
2. Las esponjas de relleno se sumergieron en el tampón y el tanque se rellenó a la mitad con el tampón de transferencia.
3. Después de la electroforesis el gel se lavó con tampón de transferencia.
4. Los componentes de la transferencia se colocaron con el orden siguiente: anodo-papel filtro saturado -membrana saturada-gel-papel filtro saturado-cátodo.

5. Las condiciones de transferencia fueron 30 V, 0.2 A a 4 °C.

B- Después de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se procedió a la inmunodetección del EF-2 con anticuerpos específicos:

Las soluciones usadas fueron:

- TBS (Tris-Buffer saline): 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5.

- TTBS: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.1% (v/v), Tween-20, pH 7.5.

- Solución de bloqueo 0.5% de leche en polvo exenta de lípidos en TBS.

- Anticuerpo primario diluido 1: 5 00 en TTBS.

- Anticuerpo secundario marcado con un radical POD diluido 1 : 5 00 en TTBS.

- Solución A contenía luminol (diacilhidrazido) cuya oxidación libera azoto y luz (Boehringer Mannheim).

- Solución B contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que es un substrato de la peroxidasa y el 4-iodofenol, un compuesto que incrementa la luminescencia (Boehringer Mannheim).

- Reveladores y fijadores de la casa KODAK: KODAK LX 24 (N° CAT: 5070933) y KODAK AL4 (N° CAT: 5071071), respectivamente.

El procedimiento fue:

1. La membrana fue lavada con TBS durante 10 minutos.

2. Se incubó en 0.5% de solución de bloqueo 1 horas. Después, fue lavada con TTBS.
  3. La membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido 1: 500 en solución de bloqueo una hora con agitación a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C sin agitación.
  4. La membrana fue lavada con TTBS 10 minutos; (30 ml por las membranas de 10x10 cm).
  5. El anticuerpo secundario cargado con POD diluido 1:500 fue añadido a la membrana y incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 mU/ml o menos son suficientes por una buena detección).
- Durante la incubación se preparan las soluciones de detección A y B.
6. La membrana fue lavada 4 veces con grandes volúmenes de TTBS durante 15 minutos cada vez.
  7. Para visualizar las bandas de proteínas específicas, se incubó la membrana con 1250  $\mu$ l de las soluciones A+B (100:1) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad.
  8. Para el revelado se colocó un film de KODAK (X-OMAT S FILM, 24x18 cm) sobre la membrana, durante un tiempo comprendido entre 10-60 segundos. Inmediatamente, se sumergió el film en revelador, cambiando a la solución de fijación cuando aparecieron las bandas específicas. Todo el protocolo se realiza bajo luz roja para evitar la impresión del film.

## 2.7. Detección de proteínas con tinción de plata.

Todos las soluciones son extemporaneas excepto el glicerol (una semana a temperatura ambiente).

### Solución fijadora

Etanol	50%
Acido Acetico	10%
Solución de DTT	0.45 mM
Solución de Nitrato de Plata	0.1%

### Solución carbonato de Sodio (1 L)

Carbonato de Sodio	2.5%
Formaldehido	0.02%

### Solución de interrupción de la tinción

Acido acético	1%
Solución de glicerol	20%

Si los geles van a ser secados usar glicerol al 2% en vez del 20% para este paso.

### Procedimiento

Este procedimiento usa un volumen de 500 ml por gel. Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación lenta a baja velocidad.

1. Los geles se fijaron una hora como mínimo (se pueden dejar toda la noche).
2. Los geles se lavaron 3 veces durante 20 minutos con agua Milli-Q durante 5 minutos (el objetivo es quitar el SDS y el fijador).

3. El gel se colocó en la solución de DTT durante 40 minutos.
4. Tras eliminar el DTT, los geles se colocaron en solución de plata durante 1 hora (Mínimo 20 minutos pero se puede dejar hasta 48 horas si fuese necesario).
5. La solución se tiró y se lavó con agua desionizada durante 5 minutos.
6. El gel se agitó con una solución (300 ml) de carbonato de sodio durante 10-30 segundos hasta que un color marrón homogéneo se empezó a desarrollar.
7. Se Añadieron 500 ml de la solución de carbonato sódico para desarrollar la imagen durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Para parar se añadió ácido acético, incubandolo durante 5 minutos. El gel se lavó durante 10 min con agua Milli-Q, tras lo cual se añadió la solución de glicerol al 20%.

#### 2.8. Determinación de los perfiles de polirribosoma en el hígado.

Para su determinación se ha seguido el métodos previamente descritos por Henshaw y col, (1971). A los animales anestesiados se les hizo una incision abdominal media para tomar una biopsia hepática, que era rápidamente sumergida en un medio cuya composición era 50 mM trimetilamina, 5 mM  $MgCl_2$ , 25 mM KCl, 0.25 M sacarosa (pH 7.3) a 0°C (Medio A). Las biopsias fueron homogenizadas con dos volúmenes del medio A. El homogenado fue

centrifugado a 20.000 x g y 2.3 ml del sobrenadante fue mezclado con 0.3 ml de 20% deoxicolato sódico y 5.2 ml de medio A conteniendo 7 mM mercaptoetanol, 2.3 M sacarosa. La suspensión resultante fue colocada en un tubo de centrifugación que contenía 3.4 ml de 2.3 M sacarosa en medio A y 0.6 ml de sobrenadante 105.000 x g de hígado control (extracto que contiene inhibidores de ribonucleasas) (1 : 2) en medio A. La preparación fue centrifugada 150.000 x g durante 35 minutos en un rotor Beckmann 65. El precipitado fue resuspendido en el medio A sin sacarosa y centrifugado 12000 x g en microfuga. La absorbancia de la suspensión fue mediada a 260 nm y un volumen correspondiendo a 4 unidades de DO se puso encima de 10 ml de 20-40% de gradiente lineal de sacarosa preparado con el mismo tampón. El gradiente fue centrifugado en un rotor Beckmann SW 40.1 a 150000 x g durante 35 minutos y bombeado con una bomba peristáltica para hacerle pasar a través de una cubeta de flujo continuo detectando variaciones en la absorción a 254 nm. El blanco obtenido a partir de la lectura de la absorbancia a 254 nm de 10 ml de 20-24% de gradiente sacarosa fue restado de todos los perfiles de polisomas. El área de las curvas del contorno polisomal fue cuantificado usando un densitómetro láser (Molecular Dynamic).

#### 2.9. Medida de la incorporación de aminoácidos en las proteínas totales y nacientes de hígado.

Para la determinación del tiempo de terminación de las cadenas peptídicas fue necesario tomar muestras después de la administración del aminoácido radioactivo, a tiempos muy cortos, inferiores o próximos al tiempo de tránsito de los ribosomas a lo largo de un RNA mensajero (RNAm) de tamaño medio. La técnica consta de las siguientes etapas: diez minutos después de anestesiarse el animal con pentobarbital (5 mg/ 100g de peso), se hace una incisión abdominal amplia y tras apartar las asas intestinales hacia un lado, se insertó una aguja en la vena porta, a través de la cual se inyecta lentamente (30 segundos) el aminoácido radioactivo (20  $\mu$ Ci de L-[3,4- $^3$ H]-valina en 0.2 ml de NaCl). Utilizamos como aminoácido radiactivo [ $^3$ H]-valina, debido a que no es oxidado ni transaminado significativamente por el hígado de rata (Mortimore y Mondon, 1970).

Se tomaron biopsias hepáticas a 0.5, 1, 1.5 y 2 minutos después de la inyección del aminoácido radioactivo, de tal manera que a cada rata se le tomaron solamente dos biopsias (a 0.5 y 1.5 minutos y a 1 y 2 minutos respectivamente). Para evitar hemorragia, la jeringuilla con la que se inyectaba el aminoácido era mantenida en la vena a lo largo del experimento y la primera biopsia hepática fue tomada ligando simultáneamente el correspondiente lóbulo. Las biopsias fueron congeladas inmediatamente entre bloques de aluminio, y almacenadas en nitrógeno líquido hasta el momento de ser homogeneizadas con tres volúmenes de sacarosa 0.3 M. Utilizamos 1.5 ml del homogeneizado



diluido en 1.5 ml de tampón : 0.1 M Tris/HCl (pH 7.6), 2 mM acetato magnésico a 0 °C y 1 ml de 0.5 M sacarosa con 1 mM acetato magnésico. Después de centrifugar a 4 000 x g durante 15 minutos, se añadió a 2 ml del sobrenadante 200 µl de deoxicolato sódico al 20%. Después 30 minutos a 4 °C, se centrifugó a 8000 x g durante 15 minutos.

Para la determinación de la radiactividad incorporada en proteínas totales, se tomó 0.5 ml del sobrenadante de la anterior centrifugación y se le añadieron 3 ml de ácido tricloroacético al 10 %. Después de centrifugar durante 10 minutos a 8 000 x g, el precipitado fue lavado dos veces con ácido tricloroacético al 10 %. El precipitado del ultimo lavado fue resuspendido en 3 ml de ácido tricloroacético al 10 % y calentado durante 30 minutos a 90 °C. El sedimento así obtenido fue lavado sucesivamente con etanol:éter:cloroformo (2 : 2 : 1, v/v/v), acetona y éter, dejándole a temperatura ambiente hasta su total desecación. Finalmente, las proteínas fueron solubilizadas mediante tratamiento con 0.4 ml de protosol, incubadas a 60 °C toda la noche hasta lograr la digestión completa del precipitado. Después de enfriar durante 30 minutos a 4 °C se añaden 17 µl de acético y se transfiere a los viales conteniendo 10 ml de líquido de centelleo (Ready Safe, Beckman).

Para la determinación de la radioactividad incorporada en cadena nacientes utilizamos 1.5 ml del sobrenadante del homogeneizado con deoxicolato. Este volumen se puso sobre 6 ml

de 1 M sacarosa, 1 mM acetato magnésico y 1 ml del sobrenadante 105 000 x g del homogeneizado de hígado control (1 : 2) en 50 mM trietanolamina, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 0.25 M sacarosa (pH 7.3). La suspensión fue centrifugada a 28.000 rpm durante 14 horas en rotor 42 Ti Beckmann a 0 °C. Tras resuspender el precipitado en 1 ml de agua destilada, las muestras se procesaron como se ha descrito anteriormente para la determinación de la radioactividad en proteínas totales.

Para comprobar la correcta inyección de valina radioactiva, se tomaron muestras de sangre del corazón. Las aliquotas de 10 µl de suero fueron transferidas a viales conteniendo 10 ml de líquido de centelleo Formula-989 (NEN research product) para la determinación de la radioactividad. Se determinó una media de 2.200 cpm.

#### 2.10. Determinación de la radioactividad de la valina específica en el hígado.

Se desproteinizaron 50 µl de homogeneizado de hígado con 1 ml de 20% TCA. Tras la centrifugación a 10.000 x g se tomaron aliquotas del sobrenadante, que fueron transferidas a viales conteniendo 10 ml de líquido de centelleo para la determinación de la radioactividad.

La radioactividad específica total de la valina soluble se determinó a lo largo del tiempo. Los resultados fueron 368.7 ± 17.8 cpm en las ratas controles y 356.7 ± 19.11 cpm en las ratas

tratadas con HC (Los valores presentan la media  $\pm$  SEM de mínimo de diez animales), con ningún cambio durante el tiempo comprendido entre 30 y 120 segundos. (ANOVA seguido del test Tukey).

### 2.11. Determinación de malondialdehído (MDA) con ácido tiobarbitúrico (TBA).

La medida de MDA con tiobarbitúrico (TBA) es el método más usual para la determinación de la peroxidación lipídica. La muestra a analizar se calienta con tiobarbiturato en un medio ácido, y se mide a 532 nm.

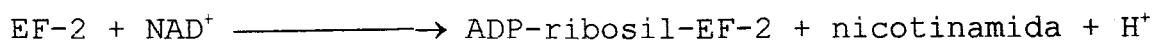
Una parte de hígado fue homogenizada en 5 volúmenes de tampón: 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 20% glicerol, 0.2 mM ditiotreitól y 0.3 mM fluorido fenilmetilsulfonilo. El homogeneizado fue centrifugado a 10.000 x g. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente 105.000 x g. El precipitado resultante fue resuspendido con el tampón de homogenización. La muestra (la suspensión de microsomas de hígado o el sobrenadante 10.000 x g) fue mezclada con 2 volúmenes de 10% (p/v) de TCA para precipitar proteínas. El precipitado fue centrifugado y una alícuota del sobrenadante fue usada para la determinación de MDA. En la reacción, una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de TBA, produciendo un compuesto coloreado que absorbe a 535 nm. La reacción se realiza a pH 2-3 a 90-100°C durante 10-15 min. El precipitado fue centrifugado y una alícuota del sobrenadante se

puso a reaccionar con un volumen igual de TBA al 0.67% (p/v), poniendo la solución en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Después de bajar la temperatura se midió la absorbancia a 535 nm y la concentración de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción molar  $\epsilon = 153.000$ .

## 2.12. ADP-Ribosilación de EF-2.

La ADP-ribosilación se define cómo resultado de una transferencia de un grupo ADP-ribosa desde el  $\text{NAD}^+$  a una proteína a nivel del aminoácido diftamida (residuo de histidina modificada (Phan L.D y col, 1993.; Blanke S.R y col, 1994), este proceso se realiza en presencia de algunas toxinas (toxina diftérica, toxina **A** de pseudomonas) según la reacción siguiente:

### Reacción de ADP-ribosilación de EF-2.



La ADP-ribosilación de EF-2 con  $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$  en presencia de TD representa un método de marcaje muy selectivo y util para la determinación del EF-2 activo en los extractos de hígado. El hígado de rata fue homogeneizado 3 volúmenes con tampón 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0.25 M sacarosa, 0.2 mM PMSF. El homogeneizado fue agitado

vigorosamente en carbon activo durante 5 minutos para eliminar el NAD endógeno. El carbon activo fue eliminado por centrifugación a 15.000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante fue centrifugado nuevamente 27.000 x g durante 15 minutos para quitar los restos celulares y el charcoal residual en suspensión. Toda la operación fue realizada a 4 °C.

La cantidad de EF-2 activo fue determinada en extracto de hígado según el procedimiento de Riis y col, (1989a; 1989b). El ensayo fue realizado en un volumen final de 500 µl en tampón constituido de 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM DTT, 1 mM EDTA, conteniendo 10 µg de TD, 0.18 M histamina y 0.1 mM [<sup>14</sup>C] NAD (0.1µCi). Se incubó la solución durante 90 minutos a 37 °C. La reacción fue parada añadiendo 1 ml de TCA frio al 10%. Después de centrifugar, la radioactividad incorporada en el precipitado fue determinada como se ha descrito anteriormente.

### 2.13. Inmunoprecipitación de EF-2 ADP-ribosilado.

La inmunoprecipitación del EF-2 ribosilado se realizo de la siguiente manera:

1. Equilibrar la Proteína A con tampón 10 mM Tris/HCl pH 7.5-7.6, 140 mM NaCl, 0.5% CHAPS, 1% DOC toda la noche a 4°C y agitación. Alternativamente 2 horas.
2. Centrifugar en la microfuga, y resuspender el pellet de proteína A, en un volumen de tampón para obtener un porcentaje final del 10%.

3. Incubar 200  $\mu$ l de proteína A con 50  $\mu$ l de anticuerpo. Dejar agitando a 4°C toda la noche.

4. Lavar el complejo proteína A-anticuerpo con tampón Tris/HCl y centrifugar en una microfuga a 4°C. Lavar tres veces. El extracto de hígado ADP-ribosilado se incubó con el complejo anticuerpo-Proteína A toda la noche a 4 °C, agitando. Las muestras fueron centrifugadas y el inmunoprecipitado fue lavado tres veces con Tris/HCl. Las proteínas inmunoprecipitadas se resuspenden en tampón de muestra de electroforesis y se incuban 10 minutos a 100 °C. Se centrifugaron y el sobrenadante se sometió a geles de poliacrilamida-SDS al 10% o IEF.

Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie y analizados en un InstantImager (Packard, U.S.A) para medir la radioactividad incorporada en las proteínas.

#### 2.14. Determinación de la cantidad de EF-2.

La determinación de la cantidad de EF-2 se llevó a cabo mediante la técnica E.L.I.S.A. (enzyme-linked immunoabsorbent assay). Previamente, se realizó un marcaje puntual para determinar la cantidad de proteína en pocillo y la concentración óptima de anticuerpo anti-EF2.

Los antígenos fueron diluidos a la concentración de 100  $\mu$ g/ml de proteínas en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.0. Se añadieron 100  $\mu$ l de muestra diluida de extracto de hígado a cada pocillos de una placa NUNC microtiter (cada muestra se ensayó

por triplicado). La placa se incubó toda la noche a 4 °C. Los sitios de unión no ocupados fueron bloqueados con 200 µl de albúmina bovina al 3% (w/v) en PBS-Tween-20. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente la placa se lavó cinco veces con PBS-Tween. Seguidamente los pocillos fueron incubados con 100 µl de anti-EF-2 diluido 1/100 en PBS-Tween durante una hora a temperatura ambiente, después del cual se lavó la placa y se incubó con un segundo anticuerpo mouse "anti-rabbit IGg POP" (peroxidasa) después de una hora de incubación a temperatura ambiente. Tras los lavados, se añadieron a cada pocillo 100 µl de solución substrato (10 mg ABTS disuelto en 100 ml de tampón citrato pH 5.8 conteniendo 0.02% de agua oxigenada). La reacción se desarrolló 60 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, procediéndose a la lectura de la absorbancia a 405 nm.

#### 2.15. Determinación de grupos carbonilos de proteínas en homogeneizada de hígado.

Esta determinación se realizó mediante la incorporación de tritio tras la reducción con borohidruro sódico tritiado según el método descrito por Lenz y colaboradores (1989). Para ello, 50 µg de proteínas del extracto fueron secadas a vacío y posteriormente tratados con tampón 1 M Tris/HCl pH 8.5, 10 mM EDTA y (NaB<sup>3</sup>[H]<sub>4</sub>) borohidruro tritiado 100 mM en 0.1 M de NaOH (actividad específica 100 µCi/mmol). Se incubaron a 37 °C

durante 30 minutos. A continuación, la proteína se precipitó con 1 ml de TCA al 10 % por centrifugación. Tras lavar tres veces, el precipitado se resuspendió por incubación a 37 °C durante toda la noche en 300 µl de ácido fórmico al 70%. Seguidamente, se procedió a la hidrólisis de la proteína por calentamiento a 145 °C con HCl 6 N durante 4 horas. Una vez hidrolizada, se separaron los aminoácidos pasándolos por una resina Dowex-50, que se lavó primeramente con 0.1 N HCl y después con 2 M NH<sub>4</sub>OH. La radioactividad se determinó en el eluido de NH<sub>4</sub>OH.

#### 2.16. Determinación de grupos carbonilos del EF-2.

El sobrenadante 105.000 x g del homogeneizado de hígado fue marcado con borohidruro sódico según la técnica de Lenz y colaboradores (1989). Después de la incubación a 37 °C durante 30 minutos, las muestras fueron dializadas con tampón PBS en el microdializador (Microdialyzer system 500, Pierce) usando una membrana de diálisis de 12000 de corte de peso molecular. El anticuerpo policlonal anti EF-2 fue incubado con 10% de proteína A sefarosa CL-4B (Sigma chemical Co.) durante 4 horas a 4 °C. El complejo resultante fue lavado 3 veces con tampón 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 1% Triton X.100, 1% DOC y 0.1% SDS. Una alícuota del sobrenadante radioactivo fue incubada con el complejo proteína A-anticuerpo toda la noche a 4 °C. Seguidamente, la muestra fue centrifugada y el inmunoprecipitado fue lavado 3 veces con tampón Tris/HCl. La radioactividad



incorporada por EF-2 fue determinada usando 10 ml de liquido de centelleo Ready-Protein liquid scintillation cocktail (Beckmann instruments).

## 2.17. Extracción y Cuantificación de la nicotinamida.

### 2.17.1. Extracción de nicotinamida.

Se ha homogeneizado un extracto de hígado 1/3 en un tampón:

Tris HCL pH 7.5	20 mM
EDTA	1 mM
PMSF	0.2 mM

Conteniendo 1µg/ml de inhibidores de proteasas (chymostatin, leupeptin, pepstatin, trypsin).

Se diluyó 1:10 en tampon Tris 20mM y se centrifugo 12.000 x g durante 15 minutos.

Los volúmenes a usar son los siguientes: 50 µl de extracto (1:10) fueron diluidos en 450 µl de acetonitrilo.

En este paso lo que ocurre es una desnaturalización de las proteínas del extracto debido a la presencia del acetonitrilo (disolvente orgánico), semejante a lo que produce el TCA.

Dichas proteínas son separadas mediante centrifugación. El sobrenadante limpio es aplicado a una resina de intercambio cationico Dowex 50. Después de equilibrar en acetonitrilo, se lavó 3 veces con acetonitrilo 100%, para eliminar particulas en suspensión. Al aplicar el sobrenadante orgánico con las

moleculas de nicotinamida, estas se unen a la resina (lo que no ocurre si se equilibra la resina en un medio acuoso, ya que en este medio la nicotinamida no desplaza el protón del agua).

Se lavó la resina con acetonitrilo 100%, con varios volúmenes para eliminar todo aquello que no se pegó.

El siguiente paso es eluir la nicotinamida y para ello se utilizó Metanol:NH<sub>4</sub>OH (92:8), (el amoníaco desplaza a la nicotinamida).

Se hizo la elución en un volumen de 0.5 ml y con agitación para que se produzca el desplazamiento. Se repite el proceso de elución y se juntaron las muestras eluidas y se filtraron en ependorff (30 KD de corte de PM). Los filtrados se añadieron a un vial de hidrolisis y secados (Savant Modelo SVC 100H) para eliminar el metanol y amoníaco. Una vez secos se procede a la derivatización con BSFTA (100 µl BSFTA + 200 µl Acetonitrilo y calentar a 135 °C durante 5 minutos).

#### 2.17.2. Cuantificación de nicotinamida con cromatografía de gases por espectrometría de masas (CG/MS).

Las muestras derivatizadas fueron analizadas usando un detector selectivo de masas acoplado con un cromatografo de gases (Hawlett Packard, modelo 6890) equipado de una columna capilar de gel de silica fundido (30 m, 0,25 mm i.d.) revestida de un pegamiento de 5% fenilo metilsilicona (Espesor de la capa 0,25

$\mu\text{m}$ ). El programa de temperatura fue realizado según el método descrito por (Jacobson y col, 1995). Los números de masas utilizados por la semicuantificación fueron  $m/z$  179 y  $m/z$  194.

#### Medida de la cantidad de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas en los diferentes extractos se realizó según el método descrito por Lowry y col. (1951) utilizando albúmina bovina como patrón.

#### 2.19. Análisis estadístico.

La evaluación estadística de los datos fue realizada con ANOVA seguido del test Tukey. La determinación de la recta de la caída del cociente  $P_n/P_t$  respecto al tiempo fue determinada por el método de los mínimos cuadrados.

### 3. Resultados.

#### 3.1. Producción de Anticuerpos monoclonales anti-EF2

La región de la molécula de EF-2 elegida para la producción de anticuerpos, se determinó usando un programa (GCG del CICA) que nos dió información sobre la hidrofobicidad de la molécula. En la secuencia (**Fig. 4.**) muestra el mapa de antigenicidad obtenido (letras en negrita y cursiva).

La región escogida pertenecía al extremo N-terminal. Concretamente, una secuencia de 10 aminoácidos (Aa**54** al Aa**64**) se acopló con una proteína soporte como se explica en Material y Métodos. Tras la inyección en conejo se obtuvieron anticuerpos policlonales, cuya especificidad se evaluó con diferentes pruebas.

El primer control, consistió en la separación de EF-2 en homogeneizado de hígado de rata mediante electroforesis y posterior transferencia electroforética a una membrana de nitrocelulosa. (**Fig. 5**).

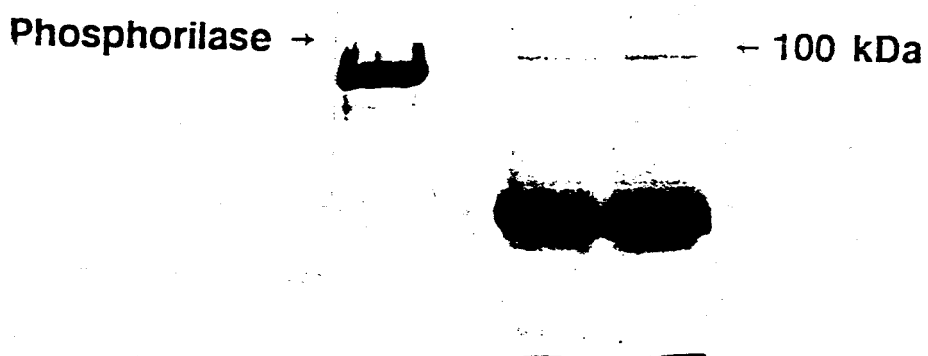
La especificidad del anticuerpo policlonal se realizó mediante inmunotinción, observándose la presencia de una sola banda correspondiendo a un peso molecular de 100 kDa.

**Figura. 4: MAPA DE ANTIGENICIDAD.**

1 MVNFTVDQIR AIMDKKANIR NVSVIAHVDH GKSTLTDSL V CKAGIIASAR  
 51 AGE~~TRFTDTR~~ ~~KDEQ~~ERCITI KSTAISLFYE LSENDLNFIK QSKDGGSGFLI  
 101 NLIDSPGHVD FSSEVTAALR VTDGALVVVD CVSGVCVQTE TVLRQAI AER  
 151 IQPVLMMNKM DRALLELQLE PEELYQTFQR IVENVNVII S TYGEGESGPM  
 201 GNIMIDPVLG TVGFGSGLHG WAFTLKQFAE MYVAKFAAKG EGQLGAAERA  
 251 KKVEDMMKKL WGDYRFDPAN GKFSKSANSP DGKKLPRTEFC QLILDPIFKV  
 301 FDAIMNFRKE ETAKLIEKLD IKLDSKDK EGKPLLKAVM RRWLPAGDAL  
 351 LQMITIHLPS PVTAQKYRCE LLYEGPPDDE AAMGIKSCDP KGPLMMYISK  
 401 MVPTSDKGRF YAFGRVFSGV VSTGLKVRIM GPNYTPGKKE DLYLKPIQRT  
 451 ILMMGRYVEP IEDVPCGNIV GLVGVDQFLV KTGITITFEH AHMMRVMKFS  
 501 VSPVVRVAVE AKNPADLPKL VEGLKRLAKS DPMVQCIIEE SGEHIIAGAG  
 551 ELHLEICLKD LEEDHACIPI KKS DPVVS YR ETVSEESNVL CLSKSPNKH N  
 601 RLYMKARFPF DGLAEDIDKG EVSARKELKA RARYLAEKYE WDVAEARKIW  
 651 CFGPDGTGPN ILTDITKGVQ YLNEIKDSV V AGFQWATKEG ALCEENMRGV  
 701 RFDVHDVTLH ADAI~~H~~RGGGQ I IPTARRCLY ASVLTAQ PRL MEPIYLV EIQ  
 751 CPEQVGGIY GVLNRKRGHV FEESQVAGTP MFVVKAYLPV NESFGFTADL  
 801 RSNTGGQAFP QCVFDHWQIL PGDPFDN SSR PCQVVAETRK RKGLKEGIPA  
 851 LDNFLDKL..

\* NAIRN A.C., PALFREY H.C. *J. BIOL. CHEM.* 262:17299-17303(1987).

Como puede verse, el anticuerpo reconoce principalmente a una sola proteína con un peso molecular similar al del EF-2 (Fig. 5).



**Fig. 5.** Analisis de la especificidad del anticuerpo policlonal contra el EF-2. El inmunoprecipitado fue analizado por electroforesis con gel de poliacrilamida-SDS, seguida por tinción con azul de comassie.

El siguiente control fue comprobar que dicha banda correspondió al EF-2. Para ello, el extracto de hígado de rata (sobrenadante 10.000 x g) fue ADP-ribosilado con nicotinamida NAD radioactivo (Amersham, UK) y toxina diftérica (TD), (ver apartado 2.12.). El extracto marcado se inmunoprecipitó con anticuerpo anti EF-2 unido a proteína A-agarosa, según se indica en el apartado 2.13. La proteína inmunoprecipitada llevaba incorporado el ADP radiactivo (controles sin TD no producían marcaje de proteína). Puesto que la única proteína que se marca con TD es el EF-2, concluimos que el anticuerpo producido es específico y con capacidad de inmunoprecipitación del EF-2.

### 3.2. Medida de los parámetros del estrés oxidativo bajo el tratamiento con HC y durante el envejecimiento.

En nuestro estudio del efecto del estrés oxidativo sobre la síntesis de proteínas, se han elegido dos modelos: el tratamiento con HC y el envejecimiento.

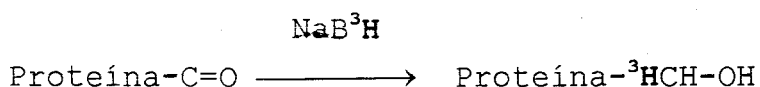
El HC, (Sies y Summer, 1975; Shimura y col, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1986; Taffe y col, 1987; Poot y col, 1988; Halliwell y Gutteridge, 1990), un agente oxidante que produce lipoperoxidación conllevando una gran producción de radicales libres, ha sido usado para ensayar el efecto de los radicales libres e intermediarios reactivos de oxígeno sobre varias biomoléculas.



Ratas jóvenes fueron tratadas con dicho oxidante y la producción de estrés oxidativo fue comprobada midiendo el incremento de grupos carbonilos en proteínas totales y la lipoperoxidación midiendo la presencia de MDA.

La determinación del contenido de grupos carbonilos es un índice del daño oxidativo, que afecta a las proteínas en general (Lenz y col, 1989; Starke-Reed y Oliver, 1989; Smith y col., 1991; Olivier y col., 1987; Garland y col., 1988). Los aminoácidos se oxidan generando derivados carbonílicos, y el contenido en carbonilos de las proteínas puede ser usado como medida del daño producido en las mismas por oxidación. Se han desarrollado procedimientos altamente sensibles para la detección y cuantificación de grupos carbonilos (Levine y col., 1990).

Los grupos carbonilos de las proteínas (p.ej: Aldehídicos, cetónicos y cetoácídicos) fueron reducidos con el borohidruro sódico. El producto final fue la introducción de tritio marcado en la cadena péptidica de las proteínas según la reacción siguiente:



El aldehído mas abundante resultante de la peroxidación lipídica, es el malonaldehído (MDA). La simplicidad de su determinación con tiobarbiturico (TBA) es uno de los métodos los más comunes en el

estudio del grado de la peroxidación de lípidos. En nuestro caso, el tratamiento con HC produjo un aumento significativo de 2.7 y 3.4 veces en el nivel de MDA en el sobrenadante 10000 x g y en la fracción microsomal, respectivamente (**Tabla 2**). Se observó el mismo incremento en grupos carbonilos en las proteínas de hígado de las mismas fracciones subcelulares (**Tabla 2**). Estos resultados reflejan que el HC produce un daño oxidativo. Asimismo, los niveles de estos parámetros fueron medidos en ratas viejas, en las cuales se ha descrito un incremento de estrés oxidativo.

Ratas (meses)	MDA (nmol/mg proteínas)		Grupos carbonilos (nmol CO/mg proteínas)	
	Sobrenadante (10000xg)	Microsomas	Sobrenadante (10000xg)	Microsomas
3	22.4 ± 2.3 (5)	28.8 ± 10.5 (5)	155.2 ± 8.10 (5)	408.5 ± 105.8 (5)
3 / HC	53.2 ± 18.0 <sup>ab</sup> (5)	97.4 ± 9.6 <sup>ac</sup> (5)	249.0 ± 10.7 <sup>ad</sup> (5)	831.9 ± 37.8 <sup>ae</sup> (5)
24	59.2 ± 7.15 <sup>ab</sup> (5)	77.0 ± 6.91 <sup>ac</sup> (5)	274.7 ± 10.9 <sup>ad</sup> (5)	637.5 ± 47.6 (5)

**Tabla. 2.** Efecto del tratamiento con HC o el envejecimiento sobre el nivel de MDA y grupos carbonilos en proteínas y EE-2. El MDA fue determinado usando ácido tiobarbiturico. Los grupos carbonilos de proteínas totales fue determinado usando borohidruro sódico radioactivo  $\text{NaB}^3[\text{H}]_4$  como se describe en Material y Métodos. Los números entre paréntesis indican el numero de ratas usadas en cada grupo.<sup>a</sup> Diferencia significativa respecto a las ratas controles (multifactor ANOVA seguido de Tukey's test,  $p < 0.05$ , 1:  $F=32.43$ ,  $p=0.0047$ ; 2:  $F=17.36$ ,  $p=0.0141$ ; 3:  $F=14,16$ ,  $p=0.0197$ ).

En nuestro estudio, se produjo un aumento significativo de 2.5 y 2 veces en el nivel de MDA en el sobrenadante 10.000 x g y la fracción microsomal, respectivamente. Los grupos carbonilos también aumentaron en las dos fracciones (**Tabla 2**).

### 3.3. Efecto del estrés oxidativo exógeno y endógeno sobre el tiempo de terminación (Tc) de la cadena polipeptídica.

A continuación, se procedió a valorar el efecto del estrés oxidativo sobre la síntesis de proteínas para conocer qué pasos de dicho proceso son modificados.

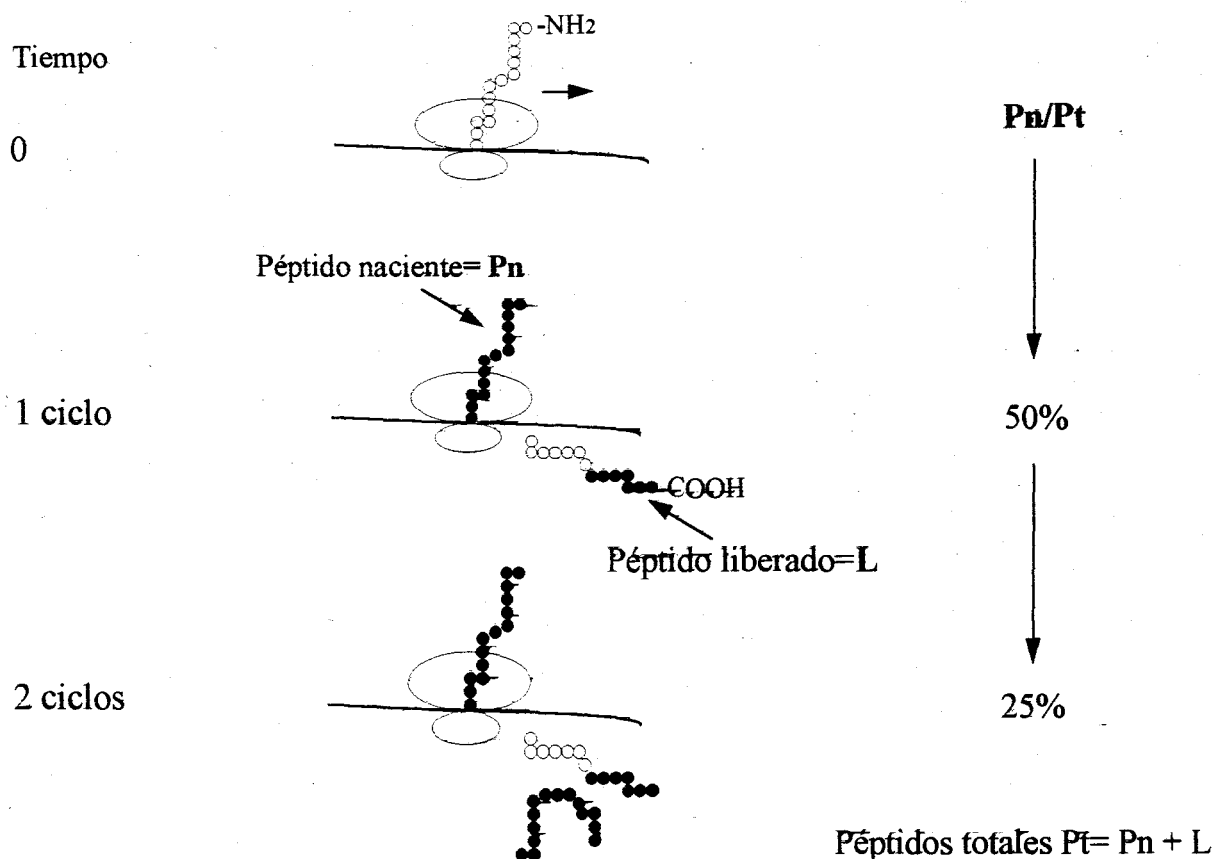
El primer parámetro medido fue la velocidad de síntesis de proteínas "in vivo", midiendo el tiempo de terminación de la cadena polipeptídica.

Esquemáticamente el método es el siguiente: se inyectó un aminoácido radiactivo (Valina tritiada) en la vena porta. Se asume que después la inyección, el aminoácido radioactivo encuentra a un promedio de ribosomas en la mitad de la traducción de un RNAm de

**Figura. 6.** Representación esquemática de los cambios en la relación radioactividad incorporada en proteínas nacientes (Pn) y proteínas totales (Pt) con respecto al tiempo.

(●) Amino acido marcado.

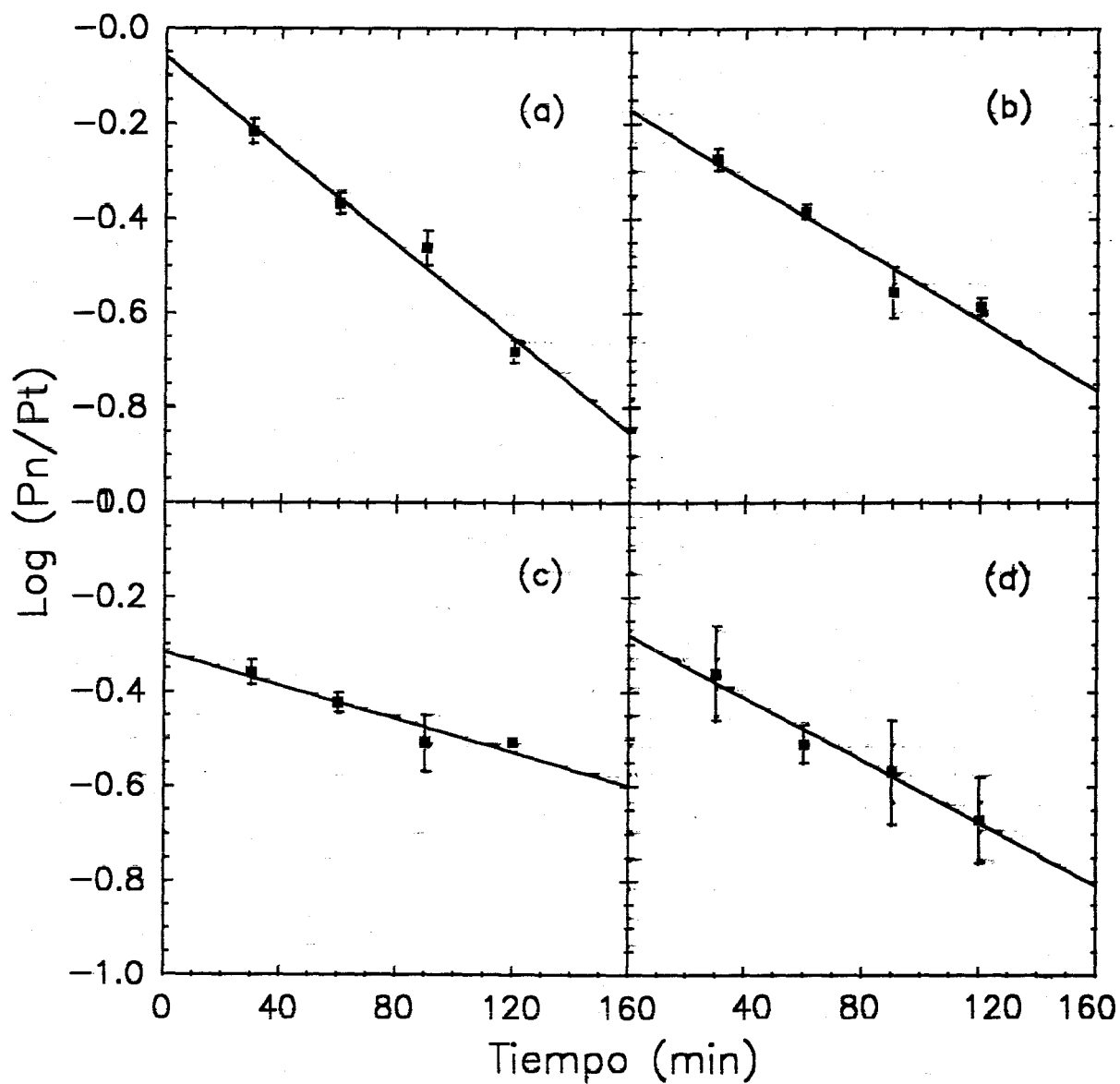
(○) Amino acido normal.



tamaño medio. Cuando se completa un ciclo de traducción, las cadenas nacientes en los polirribosomas estarán completamente marcadas, mientras que sólo lo estarán el 50% de las que han sido terminadas.

Para el cálculo del tiempo de terminación de cadenas polipeptídicas es necesario tomar biopsias a tiempos muy cortos después de la inyección del aminoácido radioactivo y además que la actividad específica del precursor no cambie a lo largo del experimento (2 minutos) (Ayuso-Parrilla y col. 1973). El tiempo necesario para que la radioactividad incorporada en los péptidos nacientes de los polirribosomas (Pn) y la radioactividad incorporada en las proteínas totales (Pt) se reduzca en 50% se define como el tiempo medio de terminación de la cadena polipeptídica, Tc (Scornick, 1974; Henshaw y col, 1971; Ayuso-parrilla y col, 1973; Ayuso-parrilla y col, 1976).

El tiempo de terminación fue obtenido directamente a partir de la pendiente de la curva Pn/Pt frente al tiempo. La **Fig. 7** presenta los valores de Pn/Pt hepáticos a varios tiempos después de la inyección del marcador en ratas control (**Fig. 7a.**), control tratadas con 12 (**Fig. 7b.**), 24 meses (**Fig. 7c.**) y control tratado con HC (**Fig. 7d.**). Los valores de TC se muestran en la **Tabla 3**. Como puede observarse, tanto en ratas que sometidas a un estrés oxidativo exógeno como en ratas viejas se produce un aumento en el tiempo de terminación de las cadenas peptídicas, siendo superior en el caso de los 2 años.



**Figura. 7.** Efecto del envejecimiento y del tratamiento con HC sobre el cociente Pn/Pt en ratas controles (a), 12 meses (b), 24 meses (c) y ratas controles tratadas con HC (d). Cada punto representa la media  $\pm$  S.E. de cuatro ratas.

Tipo de ratas	Tiempo de terminación de cadenas peptídicas (segundos)
3	60
3/HC	101
12	81
24	169.2

**Tabla. 3.** Efecto del HC y del envejecimiento sobre el tiempo medio de terminación de la cadena polipeptídica. Tc fué calculado según se describe en material y Métodos, A partir de los datos representados en la **Fig. 7** (Pn/Et frente al tiempo). Las ratas tratadas con HC recibieron inyecciones intraperitoneales (35 mg/Kg de peso /día) a las 10 a.m, durante 7 días..



Los cambios en Tc reflejan variaciones en las fases de elongación y terminación. Tc es independiente del número de ribosomas que participan en el proceso de traducción, y de las variaciones de la fase de iniciación (Ayuso-Parrilla y col, 1976).

#### 3.4. Efecto del estrés oxidativo exógeno y endógeno sobre la fase de iniciación de la síntesis de proteínas.

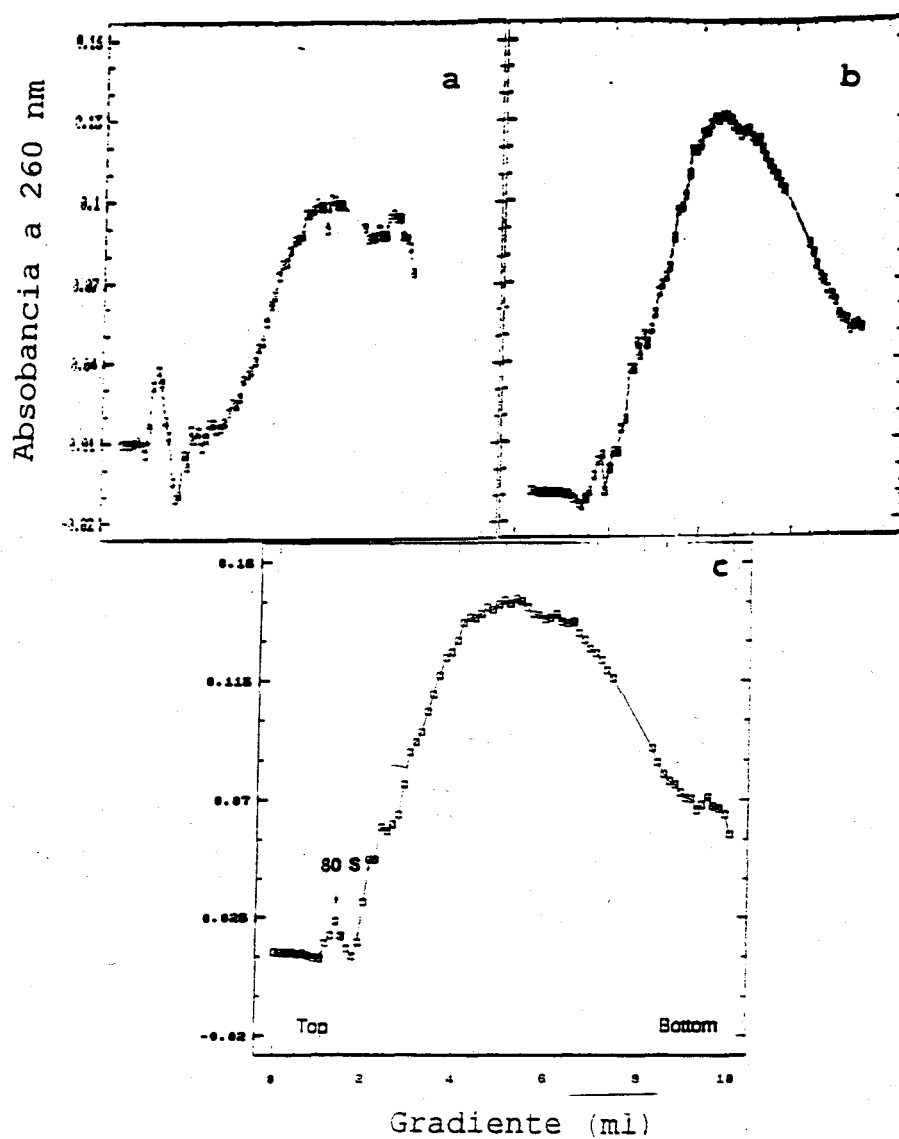
El tiempo de terminación presenta una expresión del estado de la fase de elongación y de terminación. Es independiente del número de ribosomas implicados en el proceso de traducción y tampoco estaría afectado por la fase de iniciación. A fin de determinar si el efecto observado era acompañado por una alteración del paso de iniciación se determinó el estado de agregación de los ribosomas, estudiando los perfiles de polisomas hepáticos en función de la edad.

En condiciones normales, la iniciación y la elongación están sincronizadas de tal manera que la perturbación de una de ellas provoca una variación en el estado de agregación de los ribosomas. Así, una inhibición de la iniciación de la cadena peptídica produce una acumulación de ribosomas en estado monomérico y una bajada en los polirribosomas (Ayuso-Parrilla y col, 1976). Por el contrario, una inhibición de la fase de elongación o una inhibición parcial, pero mayoritaria, produce un aumento en polirribosomas y una depleción de la

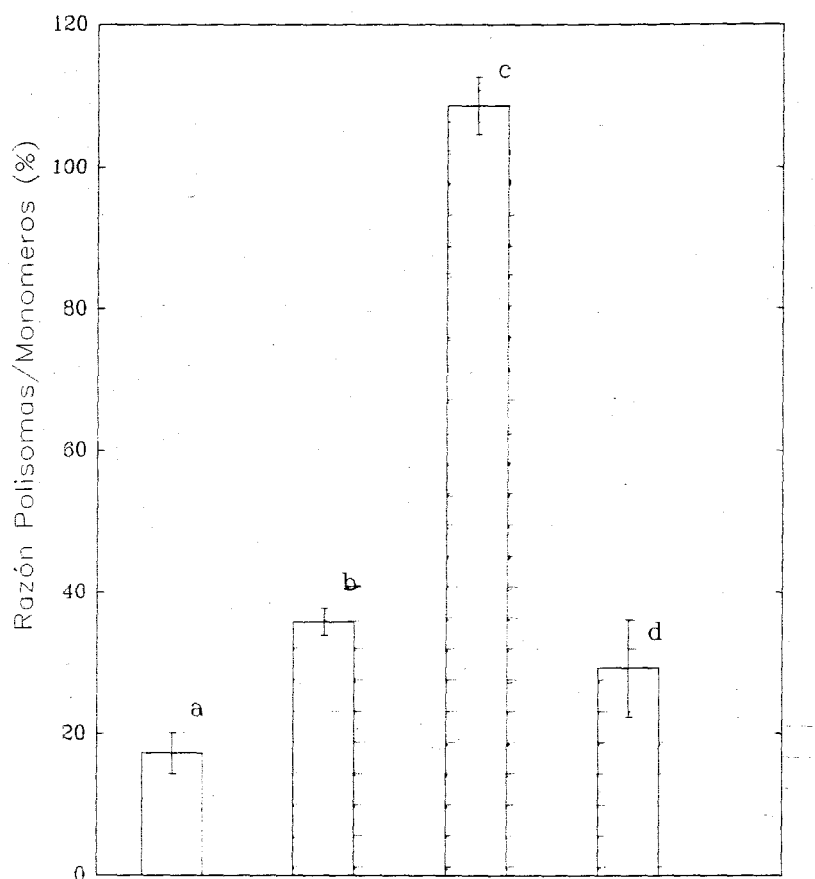
forma ribosomal monomérica (Ayuso-Parrilla y col, 1976). Ningún cambio en el estado de agregación hubiese ocurrido si las dos fases fueran inhibidas completamente.

El tratamiento con HC aumentó el estado de agregación de los ribosomas (**Fig. 8c.**) con respecto a los controles (**Fig. 8a.**). La razón polisomas/monómeros aumentó un 69,8 % en ratas tratadas con HC (**Fig. 9**). Estos resultados indican que la alteración de la síntesis de proteínas por HC es debida a cambios en la elongación de la cadena peptídica. La posibilidad de que la fase de terminación también sea afectada no puede ser excluida con este modelo usado para la determinación del Tc.

Asimismo un efecto idéntico se observó en ratas viejas. Como muestra la **Fig. 9.**, se produce un incremento del estado de agregación de los ribosomas con la edad (**Fig. 8b**) en ratas de 24 meses comparadas con ratas controles (**Fig. 8a.**). La determinación cuantitativa de este incremento se presento en la **Fig. 9**. En ella se puede observar un incremento con la edad del porcentaje de la proporción polisomas/monómeros, a, b, c y d que corresponden a 3, 12, 24 y HC, respectivamente. Estos resultados indican asimismo que la fase de elongación y/o la fase de terminación es la más afectada.



**Figura.8.** Análisis de preparaciones ribosomales con gradiente sacarosa a partir de hígado de ratas controles (a), 24 meses (b) y controles tratados con HC (c). Los perfiles de polisomas se han obtenido como se describe en Material y Métodos.



**Figura. 9.** Efecto del envejecimiento y del tratamiento con HC sobre la fracción polisomal hepática en ratas controles de 3 meses **(a)**, 12 meses **(b)** 24 meses **(c)** y ratas controles tratadas con HC **(d)**. Cada punto presenta la media  $\pm$  S.E. de cuatro ratas.

### 3.5. Efecto estrés oxidativo exógeno y endógeno sobre la cantidad y actividad del EF-2.

Una vez conocido que el paso de la síntesis de proteínas es más afectado por el estrés oxidativo, se procedió a estudiar la proteína más importante que participa la fase de elongación, el Factor de elongación 2 (EF-2)

El primer parámetro estudiado fue sus el contenido celular en EF-2, en ratas controles, en ratas sujetas a estrés oxidativo exógeno y en ratas viejas.

La cantidad total de EF-2 fue medida usando el anticuerpo policlonal obtenido frente al EF-2 (Ver Material y Métodos). En ningún caso se observó cambio en los niveles de EF-2 (Tabla 4).

Posteriormente, se procedió a medir la cantidad de diftamida presente en los extractos. Dicho residuo es esencial para que el EF-2 participa en la translocación del mRNA y es índice de la funcionalidad de dicha proteína. El EF-2 activo o ribosilable fue determinado con toxina-diftérica y NAD radioactivo como sustrato (Riis y col, 1989a, Riis y col, 1989b). Los resultados demuestran que hay una reducción de 32% de EF-2 activo en el hígado de rata tratadas con HC.

Un proceso similar ocurre en el envejecimiento, durante el cual se observa una drástica disminución de la cantidad de EF-2 activo (Tabla 4).

Hay, por tanto, una disminución de la cantidad de EF-2 activo en términos de disminución de diftamida respecto a una cantidad igual de EF-2.

El siguiente parámetro medido fue el grado de oxidación del EF-2, para ello, el EF-2 purificado de los extractos mediante inmunoprecipitación, cuantificando a continuación los grupos carbonilos presentes en el EF-2.

El tratamiento con HC también ~~cambió el estado de oxidación de~~ EF-2. Así, los niveles de grupos carbonilos fueron 2 veces mayor que en los controles (**Tabla 4**), lo que sugiere que el grado de oxidación del EF-2 es aumentado por el HC.

El envejecimiento afectó también el grado de oxidación de EF-2, (**Tabla 4**). Esto sugiere también existe un daño oxidativo que afecta al factor de elongación durante el envejecimiento.

Rata (meses)	EF-2 total (DO a 405 nm)	EF-2 ADP-ribosilable (pmol/mg proteínas)	Contenido de EF-2 en CO (nmol de grupo CO/ mg de prot.)
3	0.173 ± 0.01	13.54 ± 1.48	3.58 ± 0.53
12	0.159 ± 0.01	8.42 ± 1.66 <sup>a,b</sup>	7.94 ± 1.19 <sup>a,c</sup>
24	0.205 ± 0.01	4.46 ± 1.38 <sup>#a,b</sup>	8.60 ± 1.18 <sup>a,c</sup>
3 / HC	0.197 ± 0.016	8.92 ± 1.03 <sup>a,b</sup>	5.60 ± 0.39 <sup>a,c</sup>

**Tabla. 4.** Efecto del envejecimiento y del tratamiento con HC sobre la cantidad total del factor de elongación 2 y su estado de oxidación. La cantidad total de EF-2 se ha determinado por ELISA. La determinación de cantidad de EF-2 activo se realizó con NAD radioactivo y TD. Los grupos carbonilos de EF-2 se determinaron con borohidruro sódico radioactivo. Los resultados son la media ± S.E. de 4-5 ratas.

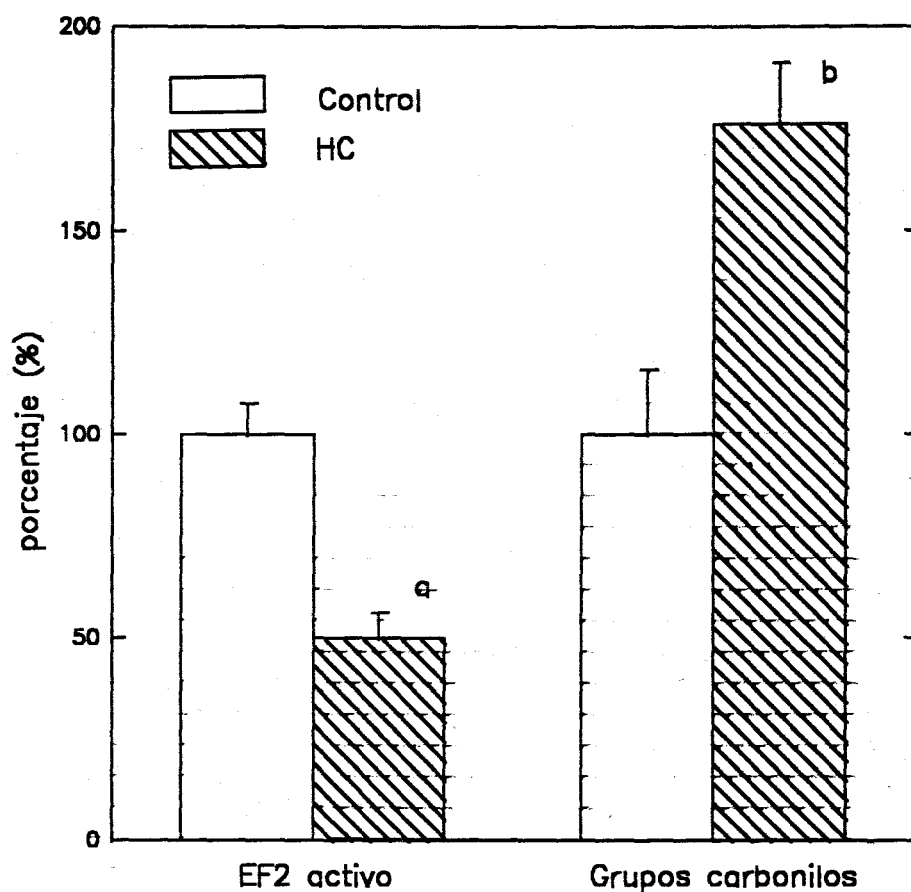
### 3.6. Efecto "in vitro" de HC sobre el EF-2 de hígado.

El experimento siguiente se realizó para estudiar "in vitro" el posible mecanismo que ocurre "in vivo". Así, se incubaron extractos de hígado controles con HC y se procedió a la medida de los parámetros anteriores, cantidad de diftamida (actividad) y el grado oxidación midiendo los grupos carbonilos específicos del EF-2. Dichos resultados son mostrados en la **Figura 10**. Así, se produjo una disminución del 45% en la incorporación de [<sup>14</sup>C]ADP-ribosa, lo que sugiere que el HC podría estar involucrado directamente en la disminución de la actividad de EF-2 activo. Además, el tratamiento de extracto de hígado de rata con HC produjo un aumento en grupos carbonilos de 1.8 veces en EF-2 respecto al nivel normal.

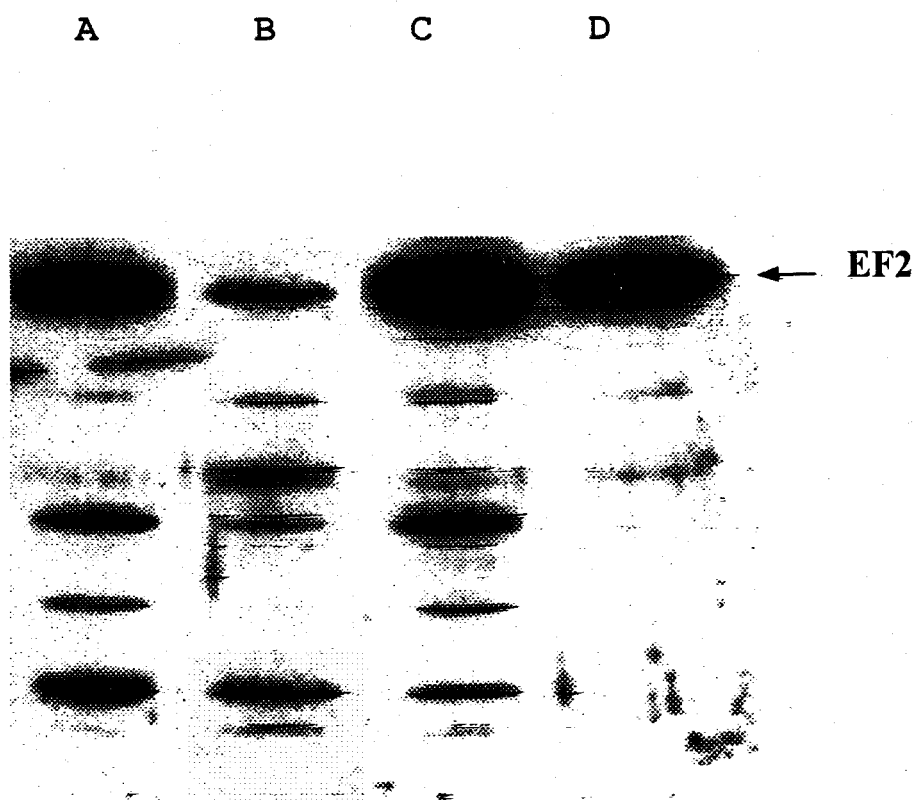
### 3.6. Determinación del peso molecular y el punto isoeléctrico de EF-2 durante el envejecimiento y con el tratamiento con HC.

Para completar nuestro estudio sobre las modificaciones que sufre la estructura del EF-2 durante el envejecimiento o durante el tratamiento con oxidantes, se analizó el peso molecular y el punto isoelectrico del EF-2 hepático extraído de ratas jóvenes, viejas y ratas tratadas con HC. En la **Fig. 11**, línea D, que corresponde a la muestras de ratas controles, se detecto una sola banda de EF-2, que tiene un peso molecular de 100 kDa.





**Fig. 10.** Efecto del HC "in vitro" sobre el contenido en EF-2 ADP-ribosilable y grupos carbonilos. los resultados estan expresados en porcentaje al control y son la media  $\pm$  S.E. de diez experimentos. El EF-2 activo esta expresado en picomoles de EF-2/mg de proteínas. El contenido en grupos carbonilos fue determinado usando con borohidrido sodico y estan expresados en nanomoles de CO/ mg de proteínas.

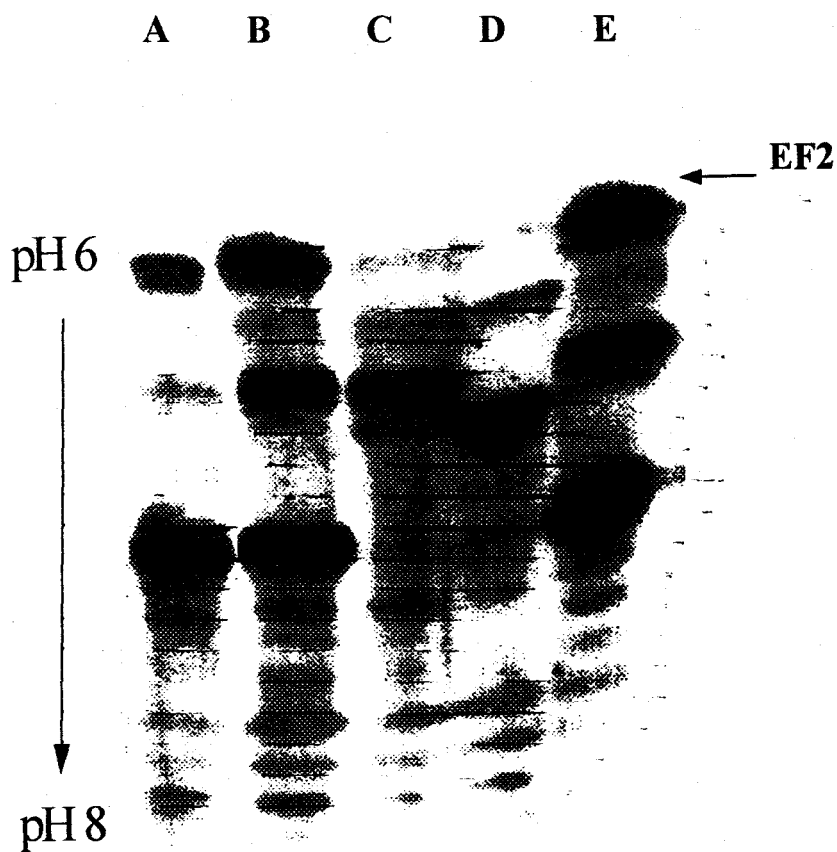


**Figure 11.** Análisis del peso molecular del EF-2 por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10 % combinado con Western Blotting. La inmunoreactividad fue detectada por el método de quimioluminiscencia detallado en Material y Métodos (Boehringer Mannheim). **A.** ratas tratadas con HC, **B.** ratas de 24 meses, **C.** ratas de 12 meses, **D.** ratas de 3 meses.

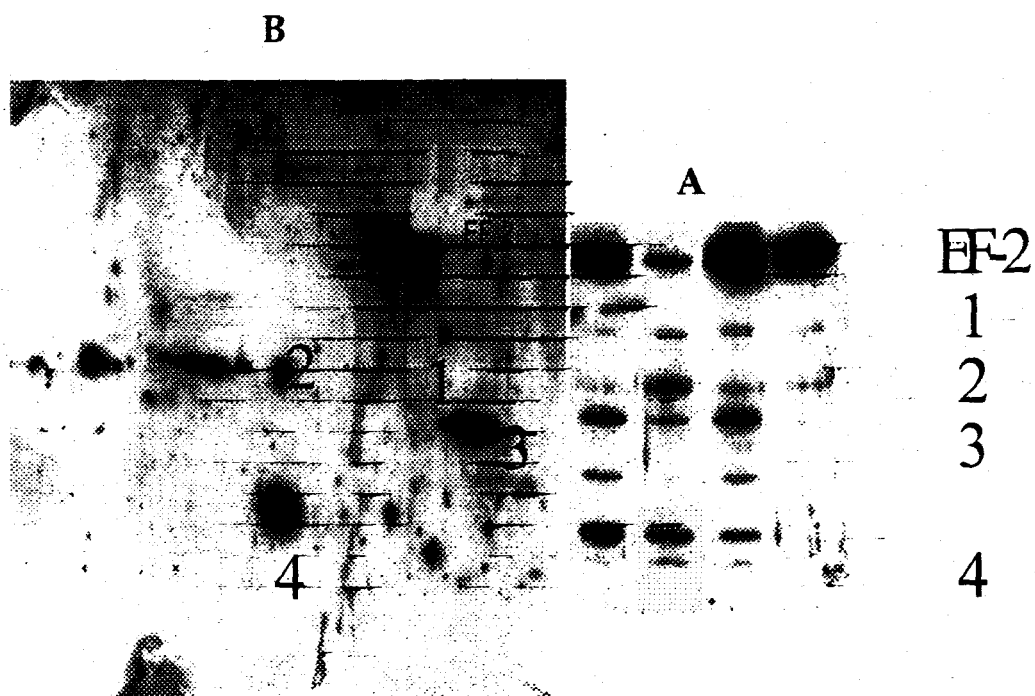
Sin embargo, algunas bandas fueron reconocidas por inmunodetección en las ratas de 12 meses (**Fig. 11**, línea C). Un perfil de bandas similar fue encontrado en ratas de 24 meses y también en ratas tratadas con HC (**Fig. 11**, líneas B y A). Estos fragmentos corresponden al extremo N-terminal de los fragmentos ya que el anticuerpo utilizado fue preparado frente a una secuencia próxima al extremo N-terminal (Ayala y col, 1996). Un fenómeno similar fue detectado por Giovane y col (1987) durante la purificación del EF-2 a partir de la placenta humana.

En el isoelectroenfoque, cuando los geles fueron transferidos e inmunoteñidos se observó una banda mayoritaria correspondiendo al EF-2 control (**Fig. 12**, línea C). El mismo EF-2 control presenta un punto isoelectrico más bajo cuando se trata con TD (**Fig. 12**, línea D). Como en el caso del análisis por PAGE-SDS, el IEF de las muestras de ratas de 12, 24 meses y ratas tratadas con HC varias bandas fueron reconocidas por el anticuerpo. La relación entre las bandas detectadas por IEF y SDS.PAGE fue demostrada por eletroforesis bidimensional 2D-PAGE (**Fig. 12**).

Además, se observó que la única banda ADP-ribosilable es la banda no-fragmentada, probablemente debido a que los fragmentos eran N-terminales sin Diftamida, la cual está situada en el extremo C-terminal (posición 715) (Van Ness y col, 1980).



**Figure 12.** Isoelectroenfoque de muestras **A.** 24 rata de meses. **B.** rata de 12 meses. **C.** rata de 3 meses. **D.** EF-2 de rata de 3 meses ADP-ribosilado. **E.** rata tratada con HC.



**Figura. 13.** **A:** Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de muestra de hígado de rata de 3, 12 y 24 meses, y control tratado con HC. **B:** 2D-SDS del extracto de hígado de rata de 12 meses.

### 3.7. Estudio del estado de fosforilación del EF-2.

Además de la ADP-ribosilación, el EF-2 se regula por la fosforilación (Ryazanov y col, 1988). Para comprobar el estado de fosforilación de las bandas obtenidas por IEF, las muestras fueron pretratadas con fosfatasa alcalina (Ryazanov y col, 1988). No se detectó ningún cambio en el punto isoeléctrico del EF-2, ni de los fragmentos presentes en las muestras de ratas de 12, 24 meses y ratas tratadas con HC.

### 3.8. Efecto del estrés oxidativo inducido exógenamente sobre la mono-ADP-ribosilación de proteínas citosólicas.

El siguiente estudio consistió en determinar una posible relación entre el estrés oxidativo y la mono-ADP-ribosilación. La mono-ADP-ribosilación es una modificación postraduccional reguladora de las funciones de proteínas, caracterizada por la transferencia de la ADP-ribosa del NAD y catalizada por una familia de enzimas, las ADP-ribosyltransferasas específicas de aminoácidos, incluyendo las poli- y las mono-ADP-ribosiltransferasas (Ueda y Hayaishi, 1985). Las poli-ADP-ribosiltransferasas (PART) son principalmente enzimas del núcleo y están implicadas en la reparación del DNA, la diferenciación celular y las transformaciones malignas (Ueda y Hayaishi, 1985). Estas enzimas son activadas por las roturas de las hebras del DNA

producidas por los radicales libres (Zhang y col, 1994; Heller y col, 1995). La activación de las PART como consecuencia de un alto grado de daño del DNA puede llevar a la muerte celular por depleción del NAD y del ATP (Yamamoto y col, 1981; Sims y col, 1983).

Al contrario de las poli-, las mono-ADP-ribosiltransferasas tienen actividad citosólica y sólo introducen un único residuo de ADP-ribosa (Ueda y Hayaishi, 1985). Estas enzimas imitan la acción de algunas toxinas bacterianas (Lee y Iglewski, 1984). Se ha identificado un gran número de proteínas citosólicas que actúan como sustrato de la mono-ADP-ribosilación. Los sustratos mejores estudiados han sido el factor de elongación-2 (Fendrick, 1989; Fendrick y col, 1992), la *glutamina sintetasa* (Liu y Kahn, 1995), ambos inhibidos por la ADP-ribosilación, las proteínas transportadoras de nucleótido de guanina (Duman y col, 1991) y ciertas proteínas estructurales (Matsuyama y Tsuyama, 1991; Huang y col, 1996; Zhou y col, 1996). Además, estos estudios han sugerido que la mono-ADP-ribosilación podría presentar un mecanismo de regulación de las funciones celulares. Su activación y las funciones celulares precisas de este proceso son poco conocidos.

Uno de los compuestos descritos como estimuladores de la mono-ADP-ribosilación de proteínas a través de la activación de las ribosiltransferasas, es el óxido nítrico (ON), un radical libre

endógeno, altamente reactivo, un inhibidor de diferentes enzimas (Schuman y col, 1994; Brune y Lapetina, 1989; Zhang y Snyder, 1992; Dimmeler y col, 1992; Mc Donald y Moss, 1993) y citotóxico a concentraciones altas. Una de las características de su citotoxicidad es la activación de la PART (Zhang y Dawson, 1994) por consumo de las reservas energéticas de la célula.

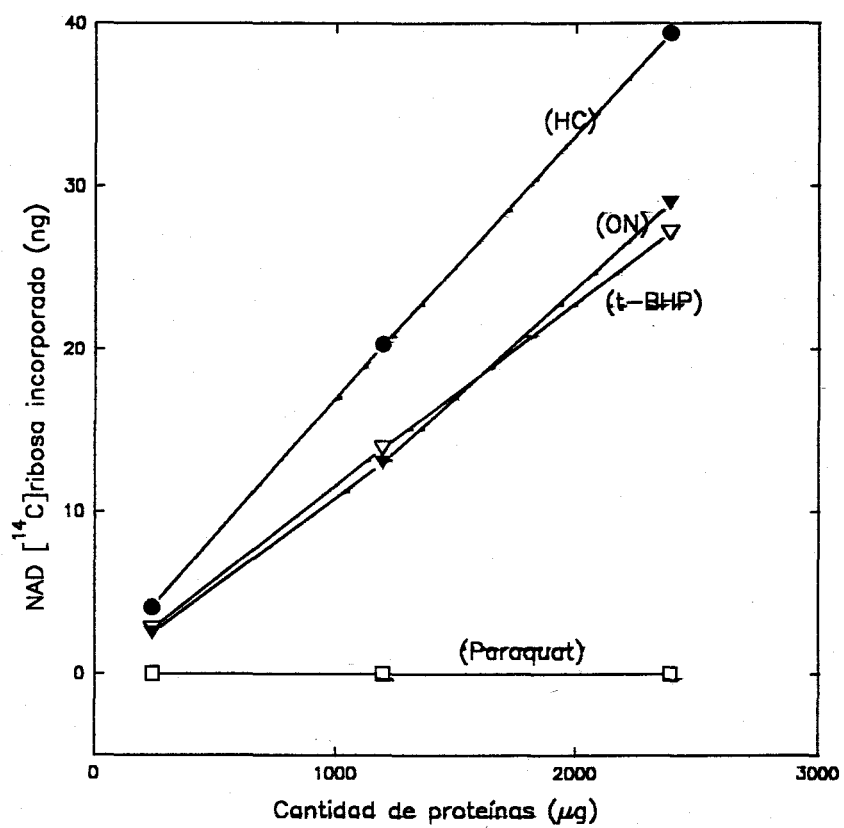
Este efecto del ON sobre la mono-ADP-ribosilación nos hizo pensar en posibilidad de que esta modificación pudiera estar regulada por los RL en general.

Para estudiar el posible mecanismo de la activación de la mono(ADP)-ribosilación de proteínas con las sustancias generadoras de RL, se trató la fracción citoplasmática del homogeneizado de hígado de rata con NAD marcado en presencia o ausencia de oxidantes y usando cantidades crecientes de proteínas. Los oxidantes utilizados fueron el óxido nítrico (ON), tBHP, HC y el paraquat como compuestos exógenos. Como se indica en la **Fig. 14**. Los compuestos inductores de la peroxidación lipídica aumentaron la mono ADP-ribosilación endógena. Sin embargo, el paraquat no afectó los niveles de ADP-ribosilación. La **Fig.14**. muestra la relación lineal entre la cantidad de muestra añadida y la mono-ADP-ribosilación. Los mayores niveles de ADP-ribosilación se encontraron en presencia de HC ( $16,9 \pm 0.3$  ng ADP /mg proteínas). En el caso del tBHP y ON el incremento medio fue  $9.5 \pm 0.12$  ng ADP/ mg proteínas y  $11.1 \pm 0.5$  ng ADP/ mg proteínas,



respectivamente. Respecto al paraquat, la incorporación del hierro al medio de incubación no produjo ningún efecto sobre la ADP-ribosilación.

Para determinar si la ADP-ribosilación endógena está relacionada con la actividad citósolica de la ADP-ribosiltransferasa o si es debida a una reacción no-enzimática con la ADP-ribosa, un homogeneizado hepático fue tratado con 0.18 M de histamina (un inhibidor endógeno de las ribosiltransferasas). La supresión de la ADP-ribosilación indica que ésta, está mediada por la actividad de las ribosiltransferasas endógenas.



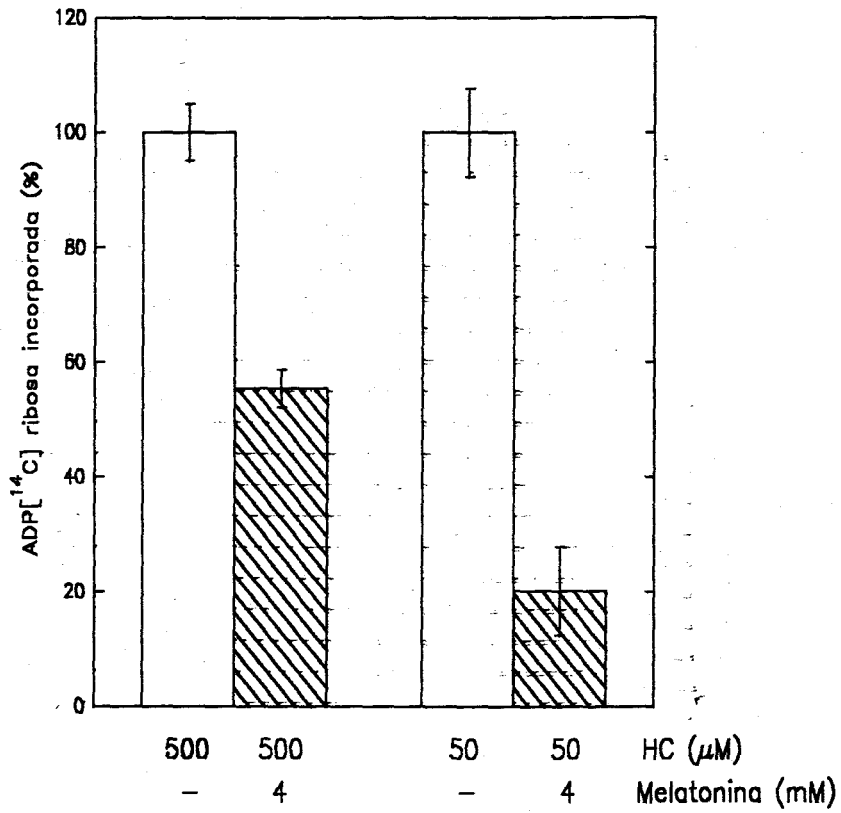
**Figura. 14.** Efecto de diferentes agentes oxidativos sobre la ADP-ribosilación de proteínas.

La posible implicación de las poli (ADP)-ribosiltransferasas ha sido estudiada usando benzamida, un inhibidor específico de estas enzimas (Rankin y col, 1989). Al contrario que la histamina, la benzamida a 20  $\mu$ M no evito la inducción de la ADP-ribosilación por los radicales libres. Estos resultados sugieren que la actividad de las mono-(ADP)-ribosiltransferasas es necesaria para la ADP-ribosilación de proteínas inducida por los radicales libres.

### 3.8.1. Efecto inhibitor de los secuestradores de RL sobre la activación de la ADP-ribosilación causada por oxidantes.

Se ha descrito que la melatonina es un potente secuestrador endógeno de radicales libres (Reiter y col, 1996) que protege contra el daño oxidativo "in vivo" (Melchiorri y col, 1995a) e "in vitro" (Melchiorri y col, 1995b) reduciendo la peroxidación de lípidos. Teniendo en cuenta que nuestros resultados sugieren que los radicales libres están involucrados directamente en la activación de las mono-ADP-ribosiltransferasas, hemos estudiado el efecto de la melatonina sobre esta activación. Para ello, aliquotas de la fracción citosólica se incubaron en presencia o ausencia de 4 mM de melatonina (Melchiorri y col, 1995) y fueron después tratados con oxidantes a dos concentraciones. La melatonina fue añadida a partir de una solución concentrada en etanol (Melchiorri y col, 1995). Como se demuestra en la Fig 15, el tratamiento con melatonina disminuye la activación de

ribosiltransferasas producida por el HC. Con una disminución de la concentración de los radicales libres (500 y 50 mM) la inhibición de ADP-ribosilación por la melatonina aumenta (44 % y 79 %, respectivamente). No obstante, este aumento no es proporcional al aumento de las concentraciones. A continuación, un homogeneizada fue tratado con etanol y melatonina solos para comprobar el efecto del etanol y la melatonina sobre la ADP-ribosilación. No se detectaron cambios. En el caso de la activación de la mono-(ADP)-ribosilación con el óxido nítrico, el tratamiento con melatonina anuló completamente la actividad ribosiltransferasa Fig. 16.



**Figura. 15.** Efecto de la melatonina sobre la ADP-ribosilación causada por HC. Los valores están expresados en porcentaje respecto al control y son la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos.

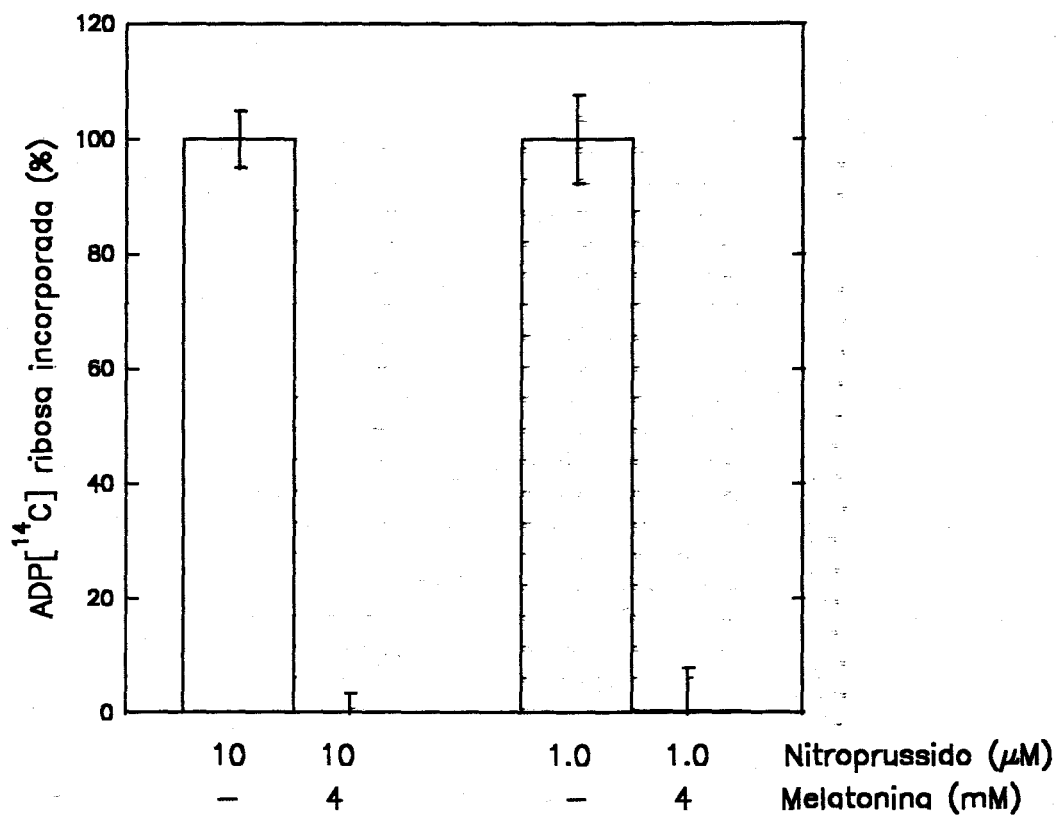
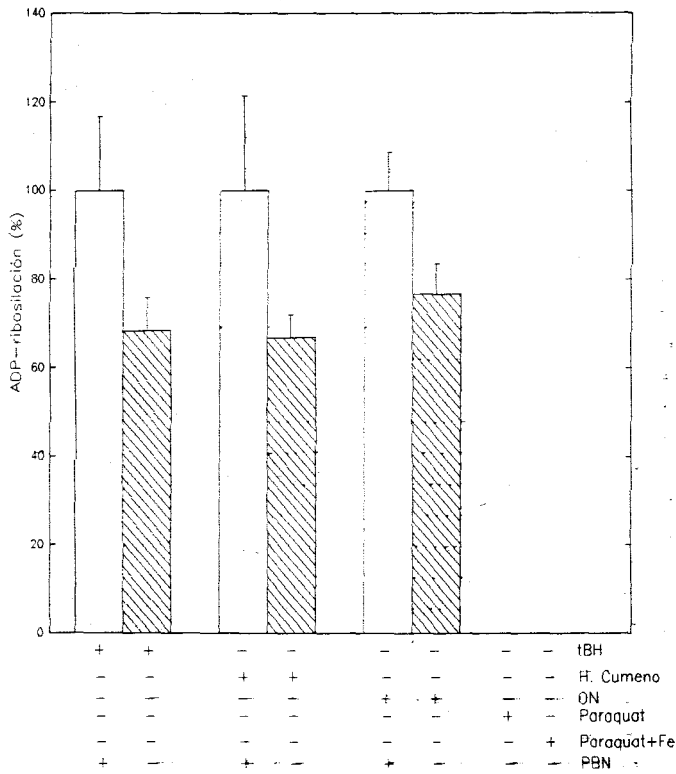


Figura 16. Efecto protector de la melatonina contra la toxicidad del ON. Los resultados se expresan en porcentaje respecto a los controles.

Por otro lado se usó también el N-tert-butil-a-fenilnitrono (PBN), un secuestrador de radicales libres cuyo efecto antioxidante ha sido descrito previamente (Davies, 1987; Davies, 1988; Buettner, 1987). Como se ve en la **Fig. 17**, la adición del PBN al medio de reacción evito el efecto de ON, CH y tBHP en 24, 33 y 32% respectivamente. Una vez más, el pretratamiento de muestras con secuestradores de radicales libres evita en parte el incremento de la ADP-ribosilación causada por los compuestos generadores de RL.



**Figura. 17.** Efecto del alpha-fenilo-N-tertibutilo-nitrona (PBN) a 50 mM, sobre la ADP-ribosilación del EF2 provocada por varios oxidantes (0.5 mM tBH, 0.5 mM HC, 0.5 mM ON y 0.5 mM paraquat con o sin Fe). Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 3 experimentos.



### 3.10. Reversibilidad de la ADP-ribosilación con Ditiotreitól.

En el curso de nuestros experimentos se observó que la presencia del DTT en el tampón de reacción interfiere con la ADP-ribosilación. Se ha descrito que el DTT puede prevenir los daños producidos por irradiación o por agentes químicos, que actúan por vía de los RL y estrés oxidativo (Demacca y col, 1993; Bhatnagar, 1994). El mecanismo por el que el DTT previene el daño oxidativo no es conocido aún. En nuestros experimentos, una concentración final de 20 mM de DTT evitó totalmente la activación de la ADP-ribosilación producida por ON, HC y tBHP. Con una concentración de DTT más baja (2 mM), la inhibición fue 68%, 65% y 67% respectivamente.

### 3.11. Determinación de nicotinamida por cromatografía de gases unido a un detector de masas.

La nicotinamida es un inhibidor endógeno celular tanto de la ADP-ribosiltransferasas citoplasmáticas y nucleares. Se ha demostrado que la nicotinamida protege contra la necrosis de hígado producida por el carbono tetraclorido (De Ferreira y col, 1994), previene el diabetes tipo I por inhibición de la PART y posiblemente por inhibición de la generación de los RL (Elliot y col, 1993) y protege contra la neurotoxicidad del MPTP (Schulz y col, 1995). Para estudiar si la nicotinamida está involucrada en la mono-ADP-ribosilación de proteínas, se determinó su cantidad al nivel de homogeneizado de hígado de rata tratado con varios generadores de RL mediante GC-MS. El

contenido en nicotinamida medido por GC-MS quedo invariable durante la reacción de ADP-ribosilación mediada por los RL.

## 4. Discusión.

### 4.1. Índice de oxidación en ratas tratadas con HC y ratas viejas.

En las condiciones utilizadas para la producción de estrés oxidativo se han medido diferentes parámetros que indican las interacciones entre RL y biomoléculas. Así, el HC es un oxidante que ha sido usado como modelo para estudiar el efecto del estrés oxidativo sobre diversos sistemas biológicos (Sies y Summer, 1975; Shimura y col, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1986; Taffe y col, 1987; Poot y col, 1988; Halliwell y Gutteridge, 1990). El tratamiento con HC produce un aumento de MDA medido con TBA (**Tabla 2**). Además, el HC produjo modificaciones oxidativas a nivel de proteínas cuyo contenido en grupos carbonilos aumentó significativamente (**Tabla 2**). Esto demuestra el estrés oxidativo producido por el tratamiento con HC.

El otro modelo usado para el estudio del efecto del estrés oxidativo sobre biomoléculas ha sido el envejecimiento en el que potencialmente se produce un aumento del daño oxidativo. Los resultados observados reflejan un incremento de MDA y un aumento en modificaciones oxidativas de las proteínas medida como grupos carbonilos (**Tabla 2**).

Así, en ambos casos, se observó la presencia de procesos de estrés oxidativo, pero de orígenes distintos.

### 4.2. Efecto del HC y el envejecimiento sobre la síntesis de proteínas.

A parte de su efecto perjudicial sobre moléculas biológicas, el HC inhibe la síntesis de proteínas en los cultivos celulares (Poot y col, 1988; Kodaman y col, 1994). Estos datos se basan en la determinación de la incorporación de aminoácidos radioactivos en proteínas. La utilización de este método "in vivo" tiene la limitación del cálculo preciso de la actividad específica del precursor endógeno "in vivo" (Mortimore y col, 1972; Airhart y col, 1974; Fern y Garlick, 1974; Lajtha y Dunlop, 1981). Con el fin de superar esta limitación, durante el estudio del efecto del HC sobre los diversos pasos de la síntesis de proteínas, se ha determinado el tiempo de terminación de la cadena polipeptídica conjuntamente con los perfiles de poliribosomas. La constante del tiempo de terminación (Tc) de la síntesis y liberación del polipeptido en el hígado de rata "in vivo" ha sido determinada mediante una técnica descrita anteriormente (Materiales y Métodos; pag. 32) (Scornik, 1974; Henshaw y col, 1971; Ayuso-Parrilla y col, 1976; Ayuso-Parrilla y col, 1973), que es independiente de la mayoría de las fuentes de variación y errores en incorporación del aminoácido. Se seleccionó la valina para medir la síntesis de proteínas debido a que es poco metabolizada por las células hepáticas (Mortimore y Mondon, 1970). Nuestros resultados muestran que el tiempo necesario para reducir Pn/Pt desde 50 a 25 % fue 1.7 veces más alto en ratas tratadas con HC (**Tabla 3**). Este aumento en Tc ocasionaría una disminución de 40% en la síntesis de proteínas por unidad de tiempo si los otros factores quedasen iguales. Estos resultados indican que el tratamiento con HC produce

una disminución de la síntesis de proteínas y que su efecto parece centrarse en la fase de elongación y/o terminación.

Un estudio idéntico ha sido realizado en ratas viejas (1 y 2 años) ya que el envejecimiento es una situación fisiológica en la que se produce una inhibición de la síntesis de proteínas, sin que se conozca el mecanismo causante de la misma.

En este estudio, los cambios de las diversas etapas de la síntesis de proteínas con el envejecimiento también se han estudiado determinando el tiempo de terminación y liberación de la cadena polipeptídica conjuntamente con los perfiles de polirribosomas. Nuestros resultados muestran que el tiempo requerido para reducir Pn/Pt. desde 50 a 25 % fue 1.35 y 2.82 veces más alto en ratas de 12 y 24 meses, respectivamente (**Tabla. 3**). Estos resultados indican que el envejecimiento, al igual que el tratamiento con HC, afecta la elongación y/o la fase de terminación.

La posible alteración de la fase de iniciación ha sido estudiada determinando el estado de agregación de los ribosomas. En condiciones normales, la iniciación y la elongación están sincronizadas de tal manera que la perturbación de una de ellas provocaría una variación en el estado de agregación de los ribosomas. Así, una inhibición de la iniciación de la cadena péptídica produce una acumulación de ribosomas en estado monomérico y una bajada en los polirribosomas (Ayuso-Parrilla y col, 1976). Por el contrario, una inhibición de la fase de elongación produce un aumento en polirribosomas y una

depleción de la forma ribosomal monomérica (Ayuso-Parrilla y col, 1976). Ningún cambio se encontraría en el estado de agregación de los ribosomas si la elongación y la iniciación estuviesen inhibidas completamente. En nuestro caso, los poliribosomas mostraron un estado de agregación más alto en el caso de hígado de ratas tratadas con HC (Fig. 8). Estos resultados indican que la elongación puede ser la etapa de la síntesis de proteínas alterado por el HC. La posibilidad de que el mecanismo de terminación de la cadena péptidica también fuera un factor limitante (modulado por HC) no puede ser excluido por este modelo de determinación de Tc.

Con respecto al envejecimiento, los perfiles de poliribosomas mostró un alto grado de agregación en hígado de ratas viejas de 12 y 24 meses. Estos resultados indican que los cambios en la elongación de la cadena péptidica puede ser un mecanismo importante en la alteración de síntesis de proteínas durante el envejecimiento.

#### 4.3. Estudio del EF-2 bajo estrés oxidativo exógeno y en el envejecimiento.

En la fase de elongación de la síntesis de proteínas participan diversos factores EF  $1\alpha$ , eEF- $1\alpha$ , eEF- $1\beta$ , eEF- $1\gamma$ , eEF- $1\delta$  y EF-2, entre los cuales, el EF-2 es un factor esencial en la regulación del paso de elongación de la síntesis de proteínas (Nygård y Nilsson, 1990; Hershey, 1991; Perentesis y col, 1992). Presenta 875 aminoácidos con una diferencia de 8 aminoácidos con el EF-2 entre el

hamster y los humanos (Rapp y col, 1989). Con el fin de investigar la posible implicación de los cambios en el EF-2 en la disminución de la velocidad de elongación por HC, se determinó el efecto del tratamiento con HC sobre la cantidad total de EF-2 en el hígado de ratas tratadas con este compuesto. Ningún cambio fue detectado en la cantidad total de EF-2 en ratas tratadas con HC respecto a ratas controles (Tabla. 4).

Siguiendo el mismo esquema, con el fin de estudiar la posible implicación del EF-2 en la reducción de la fase de elongación con el envejecimiento, se estudió el efecto de la edad sobre la cantidad total de EF-2 en ratas de edades diferentes. No se observó ningún cambio en la cantidad total de EF-2 en todos los grupos estudiados (Tabla. 4.).

Estos resultados indican que la bajada observada en el nivel de la síntesis de proteínas no es debida a una disminución en la cantidad de EF-2, y sugiere que los cambios en la fase de elongación podrían ser debidos a modificaciones postraduccionales del EF-2. Para comprobar esta posibilidad, se determinó la cantidad de EF-2 activo y su estado de oxidación.

El EF-2 es un factor que cataliza la translocación del péptidil-ARN<sub>t</sub> desde el sitio A al sitio P del ribosoma. Contiene un aminoácido modificado 2-[3-carboxiamido-3-(trimetil-amonio) propil] histidina llamado *diftamida* (residuo de histidina modificado), cuya importancia en la función de EF-2 fue definido por Perentesis (1992) y Omura (1989). La diftamida es un residuo que es específicamente ADP-

ribosilado por el fragmento A de la toxina diftérica (TD), que cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde el NAD<sup>+</sup> hacia del EF-2, inactivándolo (Hershey, 1991; Omura y col, 1989). El nivel de EF-2 ADP-ribosilable, que se usa como una medida indirecta de la cantidad de EF-2 activo en extractos (Riis, Rattan y Clark., 1989; Riis y col., 1989) puede ser determinada por el ensayo de ADP-ribosilación de la diftamida con la TD. Aunque el residuo diftamida como tal no sea importante para la función de EF-2 en la síntesis de proteínas, se ha sugerido que el residuo permite a las células regular la síntesis de proteínas por ADP-ribosilación del EF-2 (Perentesis y col, 1992; Rattan, 1991; Lee y Iglewski, 1984; Iglewski y col, 1984; Fendrick y Iglewski, 1989; Iglewski y Dewhurst, 1991; Iglewski, 1994). Durante el tratamiento con HC se observó una reducción significativa de un 32% en la cantidad de EF-2 ADP-ribosilable (**Tabla 4**). También se observó mediante la determinación de los grupos carbonilos (**Tabla 4**) que el EF-2 de hígado de ratas tratada con HC es modificado por oxidación. Puesto que las modificaciones oxidativas podrían ocurrir en una zona distinta del sitio catalítico del EF-2, estos resultados no prueban que el EF-2 este inactivado. Sin embargo, demuestran que ha sufrido modificaciones oxidativas en su estructura bajo el tratamiento con HC.

Los resultados de este mismo estudio realizados durante el envejecimiento de ratas muestra un proceso similar. Como se puede ver en la **Tabla 4**, una reducción significativa de 33 % en la cantidad de EF-2 ADP-ribosilable se observó durante el



envejecimiento. Asimismo, los resultados mostraron que el EF-2 hepático de ratas viejas este oxidativamente dañado, lo cual se pone de manifiesto por el aumento en el contenido en grupos carbonilos (**Tabla 4**).

Estos resultados, muestran que la inhibición de la síntesis de proteínas por HC y por el envejecimiento podría ser producida por cambios ocurridos a nivel de la fase de elongación y, concretamente, podía ser debida a modificaciones postraduccionales del EF-2, que conducen a un aumento en el daño oxidativo y, consecuentemente, a una reducción de la actividad de este último.

Esto pone de manifiesto una serie de similitudes entre el efecto del HC y el envejecimiento en cuanto a la disminución de la síntesis de proteínas. Estas son:

- 1- La elongación es la etapa de la síntesis de proteínas más afectada.
- 2- Disminución del EF-2 ADP-ribosilable.
- 3- Aumento de grupos carbonilos en el EF-2.

Para establecer que las modificaciones postraduccionales encontradas "*in vivo*" podrían ser debidas al estrés oxidativo, se realizó un experimento control para determinar el efecto de HC sobre el EF-2 "*in vitro*". Los resultados fueron similares a los encontrados "*in vivo*" (**Fig. 10**). Así, el HC también afecta los niveles de EF-2 ribosilable y su contenido en grupos carbonilos.

Las razones por las que disminuye la proporción de EF-2 activo bajo un estrés oxidativo producido por tratamiento de ratas con HC o por

el proceso de envejecimiento, pueden ser debidas a diversos factores:

(1) una modificación química de la diftamida por las especies reactivas de oxígeno, que elimina el efecto de la TD; (2) una activación de las ribosiltransferasas endógenas que actúan ribosilando el residuo diftamida del EF-2 y que parece ser un sistema regulador de la síntesis de proteínas como parte del metabolismo celular normal (Rattan, 1991; Lee y Iglewski, 1984; Iglewski y col, 1984; Fendrick y Iglewski, 1989; Iglewski y Dewhurst, 1991; Iglewski, 1994), (3) modificación de determinados aminoácidos del EF-2 por oxidación: el EF-2 tiene una histidina, que es esencial para su actividad (Omura y col, 1989). La histidina es uno de los residuos de aminoácidos más susceptibles al daño oxidativo (Levine, 1983; Gordillo y col, 1988). Es posible que los radicales libres producidos por HC puedan afectar a la actividad de EF-2 mediante un mecanismo que implica la inactivación por oxidación de la histidina; (4) los cambios conformacionales en el EF-2 inducidos por oxidaciones causadas por radicales libres.

La segunda posibilidad parece, en principio, razonable considerando trabajos previos, que muestran que el estrés oxidativo activa la ADP-ribosilación de proteínas que participan en el catabolismo de nucleótidos de piridina (Janero y col, 1993). Si este es el caso, la ADP-ribosilación activada por HC podría justificar la disminución del paso de elongación, ya que esta reacción es un fenómeno irreversible.

Para conocer en profundidad el proceso de inactivación del EF-2, se procedió a realizar unos estudios de caracterización molecular.

#### 4.4. Estudio del EF-2 a nivel molecular bajo estrés oxidativo y envejecimiento.

A nivel estructural, fue determinado el peso molecular del EF-2 en ratas de varias edades y en ratas tratadas con HC mediante electroforesis e inmunotinción. Se observó una fragmentación del EF-2 de ratas viejas, reflejado por la presencia de bandas cuyo peso molecular fue inferior a 97.4 kD (**Fig. 11**, línea B y C). Un caso parecido se detectó en el EF-2 de ratas tratadas con HC (**Fig. 11**, línea A). La fragmentación del EF-2 (junto con la disminución de la actividad y su mayor oxidación) podría estar implicada en la disminución de la síntesis de proteínas bajo ambas circunstancias (envejecimiento y tratamiento con oxidantes). Estos resultados de fragmentación del EF-2 parecen ser de gran importancia como mecanismo de regulación de la síntesis de proteínas a nivel de la fase de elongación (Pierrefiche y Laborit., 1995).

Una fragmentación del EF-2 similar ha sido detectada por otros autores en varios tejidos, como hígado y placenta de buey o células de levadura. Los resultados obtenidos a partir de la levadura ponen de manifiesto que el grado de fragmentación depende del estado de crecimiento. Así, en el principio de la fase exponencial, las proteínas nativas presentan un 95% del material ADP-ribosilable, pero su abundancia relativa con respecto a los fragmentos disminuye en la

mitad de fase exponencial y llega a ser insignificante en la fase de reposo celular.

En nuestro trabajo se determinó que la fragmentación del EF-2 está acelerada durante el envejecimiento y bajo el estrés oxidativo causado por compuestos oxidantes. Esta fragmentación podría ser causada por efecto directo de las ERO, las cuales podrían producir una fragmentación directa de las cadenas polipeptídicas, probablemente vía  $\alpha$ -amidación de los radicales peróxidos (Stadtman, 1993). Además, se ha descrito que la etapa de la degradación de proteínas se inicia por oxidación de las mismas. Incluso el proceso de degradación por proteasas es más favorable en el caso de las proteínas oxidadas que las no-oxidadas (Davies, 1987; Grune, 1996; Sahakian; 1995). Considerando el grado de oxidación de EF-2 (**Tabla 4**), este último podría ser fragmentado por acción proteolítica durante el envejecimiento y la acumulación de estos fragmentos se produciría por el mismo mecanismo que da lugar a la acumulación de proteínas inactivas durante el envejecimiento (Dean, 1993).

#### 4.5. Efecto del estrés oxidativo sobre la ADP-ribosilación de proteínas citosólicas.

Se ha descrito que el óxido nítrico y las ERO son importantes mediadores del daño tóxico y la activación de las poli (ADP)-ribosiltransferasas nucleares, las cuales se activan contra el deterioro que afecta al DNA (Heller y col, 1995). Una formación

excesiva de poli(ADP-ribosa) reduce los niveles de NAD e induce la muerte celular (Zhang y col, 1994).

Respecto a la función fisiológica de la mono(ADP)-ribosilación, esta es todavía desconocida. Se han descrito varias reacciones de mono(ADP)-ribosilación que afectan a proteínas relevantes, apuntando la importancia de esta modificación postraducciona en la regulación de la actividad funcional de estas proteínas "in vivo" (Ueda, 1985). Varios estudios han demostrado que la toxicidad del ON esta mediada por mono(ADP)-ribosilación de proteínas importantes. Basándonos en estas observaciones, hemos estudiado si esta modificación es una característica intrínseca del ON en particular o es una propiedad de los radicales libres en general.

Los resultados de estos estudios mostraron que la mono(ADP)-ribosilación endógena de proteínas citosólicas es aumentada por el tratamiento de extractos de hígado de rata control con todas las ERO usadas, excepto el paraquat (Nordquist y col, 1995) (**Fig. 14**). La evidencia de que el incremento de ADP-ribosilación es causado por la activación de las ribosiltransferasas es que el pretratamiento del homogeneizado con un inhibidor de esta actividad, la histamina (Gill y Dinius, 1973), inhibe esta modificación postraducciona. Este experimento también excluye la posibilidad de que el efecto observado pudiera ser debido a una ribosilación no-enzimática (Zhang and Snyder, 1992). Además, para excluir la posibilidad de que el efecto observado pudiera ser ocasionado por acción de las poli(ADP)-ribosiltransferasas presentes en el núcleo, se ha estudiado el efecto

de las ERO sobre la fracción citosólica que contiene 20  $\mu\text{M}$  de benzamida, un inhibidor de las poli(ADP)-ribosiltransferasas (Rankin y col, 1989). No hubo disminución de la ADP-ribosilación de proteínas del extracto de hígado de ratas tratadas con radicales libres en presencia de benzamida con respecto al homogeneizado de hígado de ratas tratadas con sólo con radicales libres. Esto excluye la participación de cualquier contaminación con poli-(ADP)-ribosiltransferasa en la fracción citosólica.

Para comprobar que los radicales libres están involucrados en la activación de la mono-(ADP)-ribosilación se usaron dos secuestradores de radicales libres: la melatonina (Reiter y col, 1996) y el PBN (Colado y Green, 1995). Varios autores confirmaron que la melatonina protege el organismo contra el daño oxidativo provocado por los radicales libres (Reiter y col., 1996). Además, se ha descrito que el PBN presenta diferentes grados de protección contra el daño oxidativo (Cheng y Sun, 1994). En nuestro caso, ambos compuestos impiden en cierto grado la ADP-ribosilación (Fig. 15, 16 y 17). Probablemente, ambos compuestos contribuyen a la reducción de flujo de radicales libres o de sus agentes generadores. Uno de los hallazgos que es necesario destacar es que ON y la melatonina pueden actuar recíprocamente "in vivo" y sugiere que la melatonina puede proteger contra la toxicidad del ON mediante un mecanismo que involucra la inhibición de la ADP-ribosilación de proteínas importantes. Este fenómeno demuestra el posible mecanismo de protección de la melatonina contra la oxidación de las ERO.

Por otro lado, se ha descrito que el DTT prolonga la supervivencia de los miocitos expuestos al tBHP, disminuyendo la oxidación de los tioles proteicos y no proteicos. Este compuesto preserva la carga energética (Bhatnagar, 1994) y permite una protección parcial contra el daño producido por los radicales de oxígeno introducidos artificialmente en el corazón de rata (Daniels y Duncan, 1993). El mecanismo por que el DTT previene el daño oxidativo no se conoce aún.

La presencia del DTT condiciona el efecto del estrés oxidativo en terminos de mono (ADP)-ribosilación. Asi, a concentración de 20 mM la ADP-ribosilación aumentada por la presencia de ERO es totalmente prevenida por DTT.

La siguiente cuestión que se desprende del fenómeno de la inducción de la mono(ADP)-ribosiltransferasa es ¿como los radicales libres pueden activarlas?.

Hay que señalar que semejante actividad enzimática debe estar bajo un estricto control o causaria la muerte celular. Diversos compuestos han sido descritos como inhibidores de la ADP-ribosilación. Uno de los más importantes es la nicotinamida, un producto liberado en las reacciones de ADP-ribosilación y un inhibidor tanto de la poli- y la mono(ADP)-ribosiltransferasa (Ueda, 1985; Rankin y col, 1989). Nosotros hemos estudiado si el contenido de nicotinamida disminuiría tras el tratamiento con los compuestos oxidantes. En este supuesto, el inhibidor celular de la ribosiltransferasa no interaccionaria con las enzimas, permitiendo a estas producir ADP-ribosilación en las

proteínas. Para comprobar esta posibilidad se ha medido los niveles de nicotinamida en homogeneizados de hígado de ratas tratados con oxidantes. Sin embargo, nuestros resultados muestran que los niveles permanecen constantes.

Esto sugiere que otros factores pueden estar implicados en la regulación de la actividad de las ribosiltransferasas y, consecuentemente, de la actividad de las proteínas susceptibles a ser modificadas por ADP-ribosilación. Hay que señalar que la ADP-ribosilación puede estar regulada por una gran variedad de metabolitos y constituyentes estructurales de la célula, entre otros los ácidos grasos insaturados de larga cadena que inhiben la poli- y la mono(ADP)-ribosiltransferasa y ácidos grasos saturados de larga cadena y vitamina K1, que actúan selectivamente inhibiendo las mono(ADP)-ribosiltransferasas (Banasik y col, 1992). El estudio de la interacción de los radicales libres y la mono(ADP)-ribosiltransferasa puede proporcionar un interesante acercamiento para estudiar el efecto de las ERO en la célula.

Durante los últimos años se ha descrito que las reacciones de ADP-ribosilación podrían estar implicadas en varios procesos de regulación y protección de las células. Así, se ha descrito que las células expuestas continuamente a las ERO usan una variedad de mecanismos celulares de defensa, que incluyen las poli(ADP)-ribosiltransferasas (Monti y col., 1992). Por otra parte, se ha determinado la implicación de la mono(ADP)-ribosilación en la



regulación de enzimas claves, tales como la *glicerol-3-fosfato deshidrogenasa* y el factor de elongación 2.

La realidad es que los radicales libres inducen tanto la poli (Heller y col., 1995) como la mono(ADP)-ribosilación, lo que permite especular con la posibilidad de que las células expuestas a un nivel bajo de estrés oxidativo reaccionan utilizando varios mecanismos de defensa, que incluyen los antioxidantes, las poli-(ADP)-ribosiltransferasas y las enzimas de reparación del ADN, cuya actividad consume una cantidad pequeña de NAD (Monti ucol, 1992). Sin embargo, la exposición de las células a niveles excesivos de ERO conduce a la muerte celular como consecuencia de la depleción celular en el NAD y ATP, consumidos principalmente por la actividad de las PART (Pierrefiche y Laborit, 1995) y la activación de las mono(ADP)ribosiltransferasa. Estas ultimas pararian importantes rutas bioquímicas como la glucolisis y la síntesis de proteínas una vez que el daño celular es irreversible.

BIBLIOGRAFIA.

- Airhart, J., Vidrich, A. and Khairallah, E.A. Compartmentation of free amino acids for protein synthesis in rat liver. *Biochem. J.* **140**: 539-548, 1974.
- Almassy, R.J., Janson, C.A., Hamlin, R., Xuong, N.H. and Eisenberg, D. Novel subunit-interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature* **323**: 304-309, 1986.
- Alvarez, E., Ruiz Gutierrez, V., Santa Maria, C. and machado, A. Age dependant modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech. Ageing Dev.* **71**: 1-12, 1993.
- Ames, B.N., Cathcart, R., Schirrers, E. and Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical- caused ageing and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7772-7776, 1981.
- Ames, B.N., Shigenega, M.K. and Hagen, T.M. Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta.* **1271**: 165-170, 1995.
- Ames, B.N., Shigenega, M.K. and Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 7915-7922, 1993.
- Andreani, D. Prevention of juvenile diabetes (type 1): reality or fiction?. *Bull Mem Acad R Med Belg.* **149 (12)**: 435-43, 1994.

- Angello, J.C., Pendergrass W.R., Norwood, T.H., and Prothero, J.  
Cell enlargement: One possible mechanism underlying  
cellular senescence. *J. Cell. Physiol.* **140**: 288-294, 1989.
- Aust, S.D., Morehouse, L.A. and thomas, C.E. Role of metals in  
oxygen radical reactions. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**: 3-  
25, 1985.
- Austin, S.A., Pollard, W.J., Jagus, R. and Clemens, M.J.  
Regulation of polypeptide chain initiation and activity of  
initiation factor eIF-2 in Chinese hamster ovary cell  
mutants containing temperature-sensitive aminoacyl-tRNA  
synthetases. *Eur. J. Biochem.* **157**:39-47, 1986.
- Ayala, A., Parrado, J., Bougria, M., Machado, A. Effect of  
oxidative stress, produced by cumene hydroperoxide, on the  
various steps of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **271**:  
23105-23110, 1996.
- Ayuso-Parrilla, M.S., Marin-Requero, A., Perez-Diaz, J.  
and Parrilla, R. Role of glucagon on the control of  
hepatic protein synthesis and degradation in the rat  
in vivo. *J. Biol. Chem.* **251**: 7785-7790, 1976.
- Ayuso-Parrilla, M.S., Hirsch, C.A., and Henshaw, E.C.  
Release of the nonribosomal proteins from the  
mammalian nature 40 s ribosomal subunit by  
aurintricarboxylic acid. *J. Biol. Chem.* **248**: 4394-  
4399, 1973.

- Azelis, A.E., McMullen, K.M. and Webster, G.C. Progressive reduction in protein synthesis during involution and aging of the mouse thymus. *Mech. Ageing Dev.* **20**: 361-368, 1982.
- Babior, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Eng. J. Med.* **298**: 659-668, 1987.
- Bakin, A. and Ofengand, J. Four newly located pseudouridylated residues in *E. coli* 23S ribosomal RNA are all at the Peptidyltransferase center: Analysis of new sequencing technique. *Biochem.* **32**: 9754-9762, 1993.
- Balin, A.K. and Allen, R.G. Molecular Bases of biological aging. *Clinics in Geriatric Medicine.* **5(1)**: 1-21, 1989.
- Ballard, F.G., and Read, L.C. Changes in protein synthesis and breakdown rates and responsiveness to growth factors with aging in human lung fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* **30**: 11-22, 1985.
- Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M. and Ueda, K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose)synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J. Biol. hem.* **267**: 1569-1575, 1992.
- Bandy, B. and Davison, A.J. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Rad. Biol. Med.* **8**: 523-539, 1990.

- Bandy, B. and Davison, A.J. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Rad. Biol. Med.* **8**: 523-539, 1990.
- Bast, A.K. and Goris, R.J.A. Oxidative stress, biochemistry and human disease. *Pharmaceutish Weekblad Scientific Edition* **11**: 199-206, 1989.
- Baum, J.A. and Scandalios, J.G. Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutases in maize. *Differentiation*. **13**: 133-140, 1979.
- Bell, C.E and Eisenberg, D. Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. *Biology Institute, USA*. **35 (4)**: 1137-49, 1996.
- Benedetti, A., Comporti, M., Fulcieri, R. Esterbauer, H. Cytotoxic aldehydes originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. Identification of 4,5-dihydroxydecenal. *Biochim. Biophys. Acta*. **792**: 172-81, 1984\*.
- Beswick, H.T. and Harding, J.J. Aldehydes or dicarbonyls in non enzymatic glycosilation of proteins. *Biochem J.* **226**: 385-389, 1985.
- Bhatnagar, A. Biochemical mechanism of irreversible cell injury caused by free radical-initiated reactions. *Mol Cell Biochem.* **137 (1)**: 9-16, 1994.

- Birnboim, H.C. A superoxide anion induced DNA strand-break metabolic pathway in human leukocytes: effects of vanadate. *Biochem. Cell Biol.* **66**: 374, 1988.
- Blanke, S.R., Huang, K., Wilson, B.A., Papini, E., Covacci, A. and Collier, R.J. Active-site mutations of the diphtheria toxin catalytic domain: role of histidine-21 in nicotinamide adenine dinucleotide binding and ADP-ribosylation of elongation factor 2. *Biochemistry.* **33 (17)**: 5155-61, 1994.
- Blazejowski, C.A. and Webster, G.C. Decreased rates of protein synthesis by cell-free preparations from different organs of aging mice. *Mech. Ageing Dev.* **21**: 345-356, 1983.
- Blazejowski, C.A., Webster, G.C. Effect of age on peptide chain initiation and elongation on preparations from brain, liver, kidney and skeletal muscle of the C57Bl/6J mouse. *Mech. Ageing Dev.* **25**: 323-333, 1984.
- Boveris, A. and Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **134**: 707-716, 1973.
- Bradley, M.O., Hayflick, L., and Schimke, R.T. Protein degradation in human fibroblasts WI-38. Effects of ageing, viral transformation and amino analogs. *J. Biol. Chem.* **251**: 3521-3529, 1976.
- Brinkmann, U., Brinkmann, E., Gallo, M., Scherf, U. and Pastan, Y. Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome

- segregation gene CSE1, in toxin and tumor necrosis factor mediated apoptosis. *Biochemistry*. **35 (21)**: 6891-9, 1996.
- Britton, G.W. and Sherman, F.G. Altered regulation of protein synthesis as determined by *in vitro* ribosomal assays. *Exp. Gerontol.* **10**: 67-77, 1975.
- Brune, B. and Lapetina, E. Activation of cytosolic ADP-ribosyltransferase by Nitric oxide-generating agents. *J. Biol. Chem.* **264**: 8455-8458, 1989.
- Buettner, G.R. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radic Biol Med.* **3 (4)**: 259-303, 1987.
- Buettner, G.R. The pecking order of free radicals and oxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 535-543, 1993.
- Buettner, G.R. The pecking order of free radicals and oxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 535-543, 1993.
- Calés, C., Fando, J.L., Azura, C. and Salinas, M. Developmental studies of the first step of the initiation of brain protein synthesis, role of initiation factor 2. *Mech. Ageing Dev.* **33**: 147-156, 1986.
- Carvalho, J.F., Carvalho, M. and Merrick, W.C. Biological characterization of various forms of elongation factor 1 from rabbit reticulocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **234**: 591-602, 1984.

- Carlberg, U., Nilsson, A. and Nygård, O. Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *Eur. J. Biochem.* **191**: 639-645, 1990.
- Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Landum, R.W., Cheng, M.S., Wu, J.F. and Floyd, R.A. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tetrabutyl-a-phenylnitron. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 3633-3636, 1991.
- Castañada, M., Vargas, R. and Galván, S.C. Stagemwise decline in the activity of brain protein synthesis factors and relationship between this decline and longevity in two rodent species. *Mech. Ageing Dev.* **36**: 197-210, 1986.
- Cavallius, J., Rattan, S.I.S. and Clark, B.F.C. Changes in activity and amounts of active elongation factor-1a in aging and immortal human fibroblast cultures. *Exp. Gerontology.* **21**: 149-157, 1986.
- Cerami, A. Accumulation of advanced glycosilation endproducts on proteins and nucleic acids: role in ageing. *Prog. Clin. Biol.Res.* **195**: 79-90, 1985.
- Cerami, A., Vlassara, M. and Brownlee, M. Glucose and aging. *Sci. Am.* **256**: 90, 1987.



- Cerami, A., Vlassara, M. and Brownlee, M. Role of nonenzymatic glycosylation in atherogenesis. *J. Cell. Biochem.* **30**: 111, 1986.
- Cervera, J., Levine, RL. Modulation of the hydrophobicity of glutamine synthetase by mixed-function oxidation. *FASEB J.* **2**: 2591-5, 1988.
- Chance, B., and Willians, G.R. The respiratory Chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol.* **17**: 65-71, 1956.
- Chen, J.J. and Yu, B.P. Alteration in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radical Biol. Med.* **17**: 411-418, 1994.
- Chen, J.J. and Yu, B.P. Alteration in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radical Biol. Med.* **17**: 411-418, 1994.
- Chen, J.J., Brot, N., and Weissbach, H. RNA and protein synthesis in cultured human fibroblasts derived from donors of various ages. *Mech. Ageing Dev.* **13**: 285-295, 1980.
- Chen, J.Y. and Bodley, JW. Biosynthesis of diphthamide in *Saccharomyces cerevisiae*. Partial purification and characterization of a specific S-adenosylmethionine: elongation factor 2 methyltransferase. *J Biol Chem.* **263** (24): 11692-11696, 1988.
- Climent, I. and Levine, R.L. Oxidation of the active site of glutamine synthetase: conversion of the arginine-344 to g-

- glutamyl semialdehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* **289**: 371-375, 1991.
- Colado, M.I., Green, A.R. The spin trap reagent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron prevents 'ecstasy'-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones. *Eur J Pharmacol.* **280 (3)**: 343-6, 1995.
- Cortopassi, G. and Arnheim, N. Detection of specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6927-6933, 1990.
- Cortopassi, G. and Wang, E. Modelling the effects of age-related mtDNA mutation accumulation: complex I deficiency, superoxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* **1271**: 171-176, 1995.
- Curnutte, J.T and Babior, B.M. Chronic granulomatous disease. *Adv. Hum. Genet.* **16**: 229, 1987.
- Curtis, J.H. Biological mechanisms underlying the aging process. *Science.* **141**: 686-694, 1963.
- Curtis, J.H., Leith, J. and Tilley, J. Chromosome aberrations in liver cells of dogs of different ages. *J. Gerontol.* **21**: 268-270, 1966.
- Cutler, R.G. Antioxidants and aging. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**: Suppl. 1, 373S-379S, 1991.

- Cutler, R.G. Antioxidants, aging and longevity. En: Free Radicals in Biology (Pryor W De). N Y. Academic Press. **6(11)**: 371-428, 1984.
- Cutler, R.G. The dysdifferentiative hypothesis of mammalian aging and longevity. In *The Aging Brain: Cellular and Molecular Mechanisms of Aging in the Nervous System, Aging Vol. 20*. Giacibini, E., Filogamo, G., Giacobini, G. and Vernadakis, 1-19. New York: Raven (1982).
- Daniels, S. and Duncan, C.J. Interaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and dithiothreitol and the genesis of cellular damage in the perfused rat heart. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*. **105**: 659-665, 1993.
- Davies, K. J. A. and Delsignore, M.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* **262**: 9908-13, 1987.
- Davies, K. J. A. and Goldberg, A. L. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **262**: 8220-6, 1987a.
- Davies, K. J. A. and Goldberg, A. L. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 8227-34, 1987b.

- Davies, K. J. A. and Lin, S.W. Degradation of oxidatively denatured proteins in *Escherichia coli*. *J. Free Radicals Biol. Med.* **5**: 215-23, 1988.
- Davies, K. J. A. Free radicals and protein degradation in human red blood cells. *Prog. Clin. Biol Res.* **195**: 15-27, 1985.
- Davies, K.J.A, in "Cellular antioxidant defense mechanisms" (Chow C.K. eds), **Vol. 2**, p. 320. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988.
- Davies, K.J.A. and Lin, S.W. Oxidatively denatured proteins are degraded by an ATP-independent proteolytic pathway in *Escherichia coli*. *J. Free Radicals Biol. Med.* **5**: 225-36, 1988.
- Davies, K.J.A. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defense. an hypotesis. *J. Free Radicals Biol. Med.* **2**: 155-75, 1986.
- Davies, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J. Biol. Chem.* **262**: 9895-901, 1987.
- Davies, K.J.A., Delsignore, M.E. and Lin, S.W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of aminoacids. *J. Biol. Chem.* **262**: 9902-7, 1987.
- Davies, K.J.A., Lin, S.W. and Pacifici, R.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.* **262**: 9914, 1987.

- Davies, M.J. Applications of electron spin resonance spectroscopy to the identification of radicals produced during lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids*. **44 (2-4)**: 149-73, 1987.
- Davies, M.J. Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with heme-proteins by electron spin resonance spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. **964 (1)**: 28-35, 1988.
- De Ferreira, E.C., Barnacchi, A.S., San Martin, M.F., Castro, G.D. and Castro, J.A. Nicotinamide late protective effects against carbon tetrachloride induced liver necrosis. *Exp. Mol. Pathol.* **60**: 214-223, 1994.
- Dean, R.T., Giese, S. and Davies, M.J. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 437-441, 1993.
- Del maestro, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta. Physiol. Scand.* **492**: 153-168, 1980.
- Demacca, M.M., Castro, G.D. and Castro, J.A. Antioxidative stress therapy with dithiothreitol tetraacetate. Protection against carbon-tetrachloride induced liver necrosis. *Arch. Toxicol.* **67**: 547-551, 1993.
- Dever, T.E. and Merrick, W.C. The GTP-binding domain revisited, in the Guanine-Nucleotide Binding Proteins. Common Structural and Functional Properties.. (Bosch, L., Kraal,

- B. and Parmeggiani, A., eds.) *Plenum Press, New York.* pp 235-267 (1989)
- Di Guiseppi, J. and Fridivich, Y. The toxicology of molecular oxygen. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **12**: 315-342, 1984.
- Dimmeler, S., Lottspeich, F. and Brune, B. Nitric oxide cause ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry.* **267**: 24, 16771-16774, 1992.
- Donovan, M.G., Bodley, J.W. *Saccharomyces cerevisiae* elongation factor 2 is phosphorylated by an endogenous kinase. *FEBS Lett.* **291 (2)**: 303-6, 1991.
- Draper, H.H. and Hadley, M. Malonaldehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* **186**: 421-431, 1990.
- Duman, R.S., Terwillinger, R.Z. and Nestler, E. Endogenous ADP-ribosylation in brain: Initial characterization of substrates proteins. *Journal of Neurochemistry.* **57**: 2124-2132, 1991.
- Dunn, J.A., McChance, D.R., Thropew, S.R., Lyons, T.J. and Baynes, J.W. age dependent accumulation of Ne-(carboxymethyl) lysine and Ne-(carboxymethyl)hydroxy-lysine in human skin collagen. *Biochemistry.* **30**: 1205-1210, 1991.
- Duve, de C. and Hayaishi, O. (Eds.) *Tocopherol, oxygen and biomembranes*, Elsevier/north Holland, New York, 1978.
- Elliot, R.B., Pilcher, C.C., Stewart, A., Fergussin, D. and Gregor, M.A. The use of nicotinamide in the prevention of

- type 1 diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **696**: 333-341, 1993.
- Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* **186**: 407-421, 1990
- Esterbauer, H. and Zollner, H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Rad. Biol. Med.* **7**: 197-203, 1989.
- Farber, J.M. and levine, R.L. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation: probable cation binding site in glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **261**: 4574-4578, 1986.
- Farr, S.B., D'Ari, R., and Touati, D. Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 8268-72, 1986.
- Fendrick, J.L. and Iglewski, W.J. Endogenous ADP-ribosylation of elongation factor 2 in polyoma virus-transformed baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 554-557, 1989.
- Fendrick, J.L. and Iglewski, W.J., Moehring, J.M. and Moehring, T.J. Characterization of the endogenous ADP-ribosylation of wild-type and mutant elongation factor 2 in eukaryotic cells. *Eur J Biochem.* **205 (1)**: 25-31, 1992.
- Fern, E.B. and Garlick, P.J. The specific radioactivity of the tissue free amino acid pool as a basis for measuring the

- rate of protein synthesis in the rat "in vivo". *Biochem. J.* **142**: 413-419, 1974.
- Fischer, G., Wittman-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmidt, F.X. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase are probably Identical Proteins. *Nature.* **337**: 476-478, 1989.
- Fisher, I., Arfin, S.M. and Moldave, K. Regulation of translation. Analysis of intermediary reactions in protein synthesis in exponentially growing and stationary phase chinese hamster ovary cells in culture. *Biochemistry.* **19**: 1417-1425, 1980.
- Frank, L. and Massaro, D. Oxygen toxicity. *Amer. J. Med.* **69**: 117-126, 1980.
- Freeman, B.A. and Crapo, J.D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. invest.* **47**: 412-426, 1982.
- Gabius, H.J., Engelhardt, R., Deerberg, F. and Cramer, F. Age-related changes in different steps of protein synthesis of liver and kidney of rats. *FEBS Lett.* **160**: 115-118, 1983.
- Gabius, H.J., Goldbach, S., Graupner, G., Rehm, S., and Cramer, F. Organ pattern of age-related changes in the aminoacylation synthetase activities of the mouse. *Mech. Ageing Dev.* **20**: 305-313, 1982.
- Garland, D., Russell, P., Zigler, J.S. In: Simic, M.G., Taylor, K.S., Ward, J.F., C von Sonntag (Eds) *Oxygen radicals in*



- biology and Medicine*. . Plenum, New York. **pp:** 347-353, 1988.
- Gazzola, G.C., Bussolati, O., Longo, N., Dall'asta, V., Franchi-Gazzola, R., and Guidotti, G.G. effect of in vitro ageing on the transport of neutral aminoacids in human fibroblasts. *Monogr. Dev. Biol.* **17:** 234-244, 1984.
- Gazzola, G.C., Dall'Asta, V., and Guidotti, G.G. The transport of neutral aminoacid in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **255:** 929-936, 1980.
- Gerschmann, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Fenn, W.O. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science.* **119:** 623-626, 1954.
- Ghibelli, L., Nosseri, C., Coppola, S., Maresca, V. and Dini, L. The increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis by ADP-ribosylation inhibitors is related to cell blebbing. *Exp Cell Res.* **221 (2):** 470-7, 1995.
- Gill, M.D. and Dinius, I.I. The elongation factor 2 content of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **248:** 654-658, 1973.
- Gordillo, E., Ayala, A., Bautista, J., Machado, A. Implication of lysine residues in the loss of enzymatic activity in rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase found in aging. *J. Biol. Chem.* **264:** (29) p17024-8, 1989.
- Gordillo, E., Ayala, A., F-lobato, M., Bautista, J and Machado, A. Possible involvement of histidine residues in the loss of

- enzimatic activity of rat liver malic enzyme during aging. *J. Biol. Chem.* **263**: 8053-8057, 1988.
- Goto, Y. Lipid peroxides as a cause of vascular disease. In *Lipide peroxides in Biology and Medicine* (K. Yagi, De.), pp. 295-303, Academic Press, New York, 1982.
- Grune, T., Reinheckel, T. and Davies, KJA. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J. Biol. Chem.* **271**: 15504-15509, 1996.
- Gschwendt, M., Kittstein, W. and Marks, F. Sequence similarity between cyclophilin and elongation factor 2. *Biochem. J.* **256**: 1061-1061, 1988.
- Gschwendt, M., Kittstein, W., Mieskes, G. and Marks, F. A type-2A protein phosphatase dephosphorylates the elongation factor-2 and is stimulated by the phorbol ester TPA in mouse epidermis *in vivo*. *FEBS Lett.* **257**: 357-360, 1989.
- Gutell, R.R., Weiser, B., Woese, C.R., and Noller, H.F. Comparative anatomy of 16-S-like ribosomal RNA. *Proc. Nucleic acids Rev.* **32**: 155-216, 1985.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*, pp. 72-78, eds: B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge. Clarendon Press, Oxford, 1986.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: *Free Radicals in Biology and*

- Medicine, pp. 139-205, 1986. eds: B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* **186**: 1-85, 1990.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd Ed. Oxford Univ. Press (Clarendon), Oxford, 1989.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals transition metals and disease. *Biochem J.* **219**: 1-14, 1984.
- Halliwell, B. Free radicals, oxygen toxicity and ageing. In *age pigments* (R. S. Sohal, De.), pp. 1-62. Elsevier, Amsterdam.
- Halliwell, B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB.J.* **1**: 358, 1987.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* **345 (6274)**: 458-60, 1990.
- Harlow, E. and Lane, D. "Antibodies. A laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
- Harman, D. Aging a theory based on free radical radiation chemistry. *J Gerontol.* **11**: 298-300, 1956.
- Harman, D. Free radical theory of aging: Effect of free radical reactions inhibitors on the mortality rate of mal LAF mice. *J. Gerontol.* **23**: 476-482, 1968.

- Harman, D. The aging process. *Proc Natl Sci (USA)*. **78 (11)**: 7124-7128, 1981.
- Haschemeyer, A.E.V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **62**: 128-135, 1969\*.
- Hasegawa, E., Takeshige, K., Oishi, T., Murai, Y. and Minikami, S. 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) induces NADH dependent superoxide formation, and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bivine heart submitochondrial particles. *biochim. Biophys. Res. Commun.* **170**: 1049-1055, 1990.
- Hata, R. Age-dependente changes in collagen metabolism and response to hypertonic culture conditions of rat aortic smooth muscle cells and skin fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* **14**: 25-33, 1990.
- Hayaishi, O., Ueda, K. eds. ADP-Ribosilation Reactions: Biology and medicine. New York: Academic. pp 3-16, 1982.
- Hegner, D. Age-dependance of molecular and functional changes in biological properties. *Mech. Ageing Dev.* **14**: 101-118, 1980.
- Hegner, D. Age-dependance of molecular and functional changes in biological properties. *Mech. Ageing Dev.* **14**: 101-118, 1980.
- Heller, B., Wang, Z.Q., Wagner, E.F., Radons, J., Burkle, A., Fehsel, K., Burkart, V. and Kolb, H. Inactivation of the

- poly(ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 11176-11180, 1995.
- Henshaw, E.C., Hirsch, C.A., Morton, B.E. and Hiatt, H.H. Control of protein synthesis in mammalian tissues through changes in ribosome activity. *J. Biol. Chem.* **246**: 436-446, 1971.
- Hershey, J.W.B. Translational control in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 717-755, 1991.
- Hill, H.A.O. Oxygen, oxidases, and the essential trace metals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **294**: 119- 28, 1981.
- Hiremath, L.S., Hiremath, S.T., Rychlik, W., Joshi, S., Domier, L.L., and Rhoades, R.E. In vitro synthesis, phosphorylation, and localization on 48 S initiation complexes of human protein synthesis initiation factor 4E. *J. Biol. Chem.* **264**: 1132-1138, 1989.
- Hosbach, H.A. and Kubli, E. Transfer RNA in aging drosophila: Y. Extent of aminoacylation. *Mech. Ageing Dev.* **10**: 131-140, 1979.
- Hosbach, H.A., and Kubli, E. Transfer RNA in ageing Drozophila. II. Isoacceptors patterns. *Mech. Ageing Dev.* **10**: 141-149, 1979.
- Huang, H.Y., Zhou, H., Huiatt, T.W. and Graves, D.J. Target proteins for arginine-specific mono(ADP-ribosyl) transferase

- in membrane fractions from chick skeletal muscle cells. *Exp. Cell Res.* **226**: 147-153, 1996.
- Iglewski, W.J. and Dewhurst, S. Cellular mono (ADP-ribosyl)transferase inhibits protein synthesis. *FEBS Lett.* **283**: 235-238, 1991.
- Iglewski, W.J. Cellular ADP-ribosylation of elongation factor-2. *Mol. Cell. Biochem.* **138**: 131-133, 1994.
- Iglewski, W.J., Lee, H. and Muller, P. ADP-ribosyltransferase from beef liver which ADP-ribosylates elongation factor-2. *FEBS Lett.* **173**: 113-118, 1984.
- Imlay, J. A., and Linn, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.* **240**: 1302, 1988.
- Imlay, J. A., and Linn, S. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **169**: 2967, 1987.
- Jacobson, El., Dame, A.J., Pyreck, J.S., and Jacobson, M.K. Evaluating the role of niacin in human carcinogenesis. *Biochimie.* **77 (5)**: 394-398, 1995.
- Janero, D.R., Hreniuk, D., Sharif, H.M. and Prout, K.C. Hydroperoxide-induced oxidative stress alters pyridine-nucleotide metabolism in neonatal heart-muscle cells. *Am. J. Physiol.* **264**: 1401-1410, 1993.
- Jobsis, F.F., and LaManna, J.D. Kinetics aspects of intracellular redox reactions: in vivo effects during and after hypoxia and ischemia. In: Robin E.G. (Editor)

- Extrapulmonary Manifestations of Respiratory Disease. New York, Marcel Dekker. 63-70, 1978.
- Jocelyn, P.C. Biochemistry of the thiol group. *Academic press*. London, 1972.
- Johansen, L.B. and Rattan, S.I.S. Protein synthesis and ageing. *Rev. Clin. Geront.* **43**: B87-B92, 1993.
- Kamath, A. and Chakraborty, K. Role of yeast elongation factor 3 in the elongation cycle. *J. Biol. Chem.* **264**: 15423-15428, 1989.
- Keherer, J. Free radicals as Mediators of tissue injury and disease. *Critical Review in Toxicology.* **23**: 21-48, 1993
- Kim, J.D., Yu, B.P., McCarter, R.J., Lee, S.Y. and Herlihy, J.H. Exercise and diet modulated cardiac lipid peroxidation and anti-oxidant defences. *Free Radical Biol. Med.* **20(1)**: 83-88, 1996.
- Kirkwood, T.B. The nature and causes of ageing. *Ciba Found Symp* (NETHERLANDS) **134**: 193-207, 1988.
- Kodaman, P.H., Aten, R.F. and Behrman, HR. Lipid hydroperoxides evoke antigonadotropic and antisteroidogenic activity in rat luteal cells. *Endocrinology.* **135**: 27-23, 1994.
- Kowalds, A., Kirkwood, T.B. Towards a network theory of ageing: a model combining the free radicals theory and and the protein error theory. *J. Theor. Biol.* **168 (1)**: 75-94, 1994.

- Kozak, M. The scanning model for translation: an update. *J. Cell. Biol.* **108**: 229-241, 1989.
- Kyle, M.E., Nakae, D., Sakaida, I., Miccadei, S., and Farber, J.L. Endocytosis of superoxide dismutase is required in order for the enzyme to protect hepatocytes from the cytotoxicity of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **263**: 3784-9, 1988.
- Labella, F.S. and Paul, G. Structure of collagen from human tendon as influenced by age and sex. *J. Gerontol.* **20**: 54-59, 1965.
- Laemmli, E.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685, 1970.
- Lajtha, A. and Dunlop, D. Turnover of proteins in the nervous system. *Life Sci.* **29**: 755-767, 1981.
- Lazariz-Karatzas, A., Montine, K.S. and Sonenberg, N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature.* **345**: 544-547, 1990.
- Lee, D.W. and Yu, B.P. Modulation of free radicals and superoxide dismutase by age and dietary restriction. *Aging Clin. Exp. Res.* **2**: 357-362, 1990.
- Lee, H. and Iglewski, W.J. Cellular ADP-ribosyltransferase with the same mechanism of action as diphtheria toxin and Pseudomonas toxin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 2704-2708, 1984.



- Lenz, A.G., Costabel, U., Shaltiel, S. and Levine, R.L.  
Determination of carbonyl groups in oxidatively modified  
proteins by reduction with tritiated sodium borohydride.  
*Anal. Biochem.* **177**: 419-425, 1989.
- Levenbook, L. Protein synthesis in relation to insect aging: an  
overview, in: Collatz, K.G. and Sohal, R.S. (Eds). *Insect  
Aging*, Springer, Berlin, pp 200-206, 1986.
- Levine, R.L. Oxidative modification of glutamine synthetase. I.  
Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J.  
Biol. Chem.* **258**: 11823-11827, 1983.
- Levine, R.L., Garland, D., Olivier, C.N., Climent, I., Lenz,  
A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S. and Stadtman, E.R.  
Determination of carbonyl content in oxidatively modified  
proteins. *Methods Enzymol.* **186**: 464-478, 1990.
- Levine, R.L., Olivier, C.N., Coon, M.J. and Stadtman, E.R.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 1521, 1981\*.
- Lewis, C.M. and Tarrant, G.M.. Error theory and aging in human  
diploid fibroblasts. *Nature.* **239**: 316-318; 1972.
- Lissi, E.A., Salim-Hanna, M., Faure, M., and Videla, L.A. 2,2'-  
Azo-bis-amidinopropane as a radical source for lipid  
peroxidation and enzyme inactivation studies. *Xenobiotica.*  
**21**: 995-1001, 1991.
- Liu, Y. and Kahn, M.L. ADP-ribosylation of *Rhizobium meliloti*  
glutamine synthetase III in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**: 1624-  
1628, 1995.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.  
Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275, 1951.
- Machado, A. Modificaciones de las proteínas producidas durante el envejecimiento. *Medicina Geriátrica*. Vol.1, Nº5, pp:307-312, 1988.
- Maessen, G.D.F., Amons, R., Zeelen, J.P. and Möller, W. Primary structure of elongation factor 1 gamma from *Artemia*. *FEBS Lett.* **223**: 181-186, 1987.
- Mainwaring, W.I.P. The effect of age on protein synthesis in mouse liver. *Biochem. J.* **113**: 869-878, 1969.
- Makrides, S.C. Protein synthesis and degradation during aging and senescence. *Biol. Rev.* **58**: 343-422, 1983.
- Marcillat, O., Zhang, Y., Lin, S.W. and Davies, K.J.A. Mitochondria contain a proteolytic system which can recognize and degrade oxidatively-denatured proteins. *Biochem. J.* **254**: 677, 1988.
- Matsuyama, S. and Tsuyama, S. Mono-ADP-ribosylation in brain: Purification and characterization of ADP-ribosyltransferases affecting actin from rat brain. *J. Neurochem.* **57**: 1380-1397, 1991.
- Mays, L.L., Lawrence, A.E., Ho R.W., and Ackley, S. Age-related changes in function of transfer RNA from rat liver. *Fed. Proc.* **38**: 1984-1988, 1979.

- Mc Donald, L.J. and Moss, J. Nitric oxide-independent, thiol associated ADP-ribosylation inactivates aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **268**: 17878-17882, 1993.
- McCarter, R.J., Masoro, E.J. and Yu, B.P. Does food restriction retard aging reducing metabolic rate? *Am. J. Physiol.* **248**: E488-E490, 1985.
- McCarter, R.J., Masoro, E.J. and Yu, B.P. Does food restriction retard aging reducing metabolic rate? *Am. J. Physiol.* **248**: E488-E490, 1985.
- McConKey, D.J., Hartzell, P., Nicotera, P., Wyllie, A.H., and Orrenius, S. Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol. Lett.* **42**: 123-30, 1988.
- McCord, J.M. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation.. *Fed. Proc.* **46 (7)**: 2402-2406, 1987.
- Medvedev, Z.A. Age-related changes of transcription and RNA processing. In: Platt D. (Ed), *Drugs and aging*, springer, Berlin. pp: 1-19, 1986.
- Melchiorri, D., Reiter, R.J., Attia, A.M., Hara, M., Burgos, A. and Nistico, G. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sciences.* **56**: 83-88, 1995a.

- Melchiorri, D., Reiter, R.J., Sewerynek, E., Chen, L.D. and Nistico, G. Melatonin reduces kainate-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. *FASEB. J.* **9**: 1205-1210, 1995b.
- Melefors, Ö. and Hentze, M.W. Translational regulation by mRNA/protein interactions in eukaryotic cells: ferritin and beyond. *BioEssay.* **15**: 85-90, 1993.
- Mello Filho, A.C. and Meneghini, R. In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **781**: 56, 1984.
- Mello Filho, A.C., Hoffman, M.E. and Meneghini, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.* **218**: 273-5, 1984.
- Miquel, J. and Fleming, J.E. Testing ageing theories. En: *Drosophila as a model organism for ageing studies* (Lints FA y Soliman MH Eds). Glasgow. Blackie. 17-29, 1988.
- Moldave, K. Eukaryotic protein synthesis. *Annu. Res. Biochem.* **54**: 1109-1149; 1985.
- Monnier, V.M. Nonenzymatic glycosilation, the Maillard reaction and the aging process. *J. Gerontol. Biol. Sci.* **45**: 105-111, 1990.
- Mortimore, G.E. and Mondon, C.E. Inhibition by insulin of valine turnover in liver. *J. Biol. Chem.* **245**: 2375-2383, 1970.

- Mortimore, G.E., Woodside, K.H. and Henry, J.E. Compartmentation of free valine and its relation to protein turnover in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **247**: 2776-2784, 1972.
- Nairn, A.C. and Palfrey, H.C. Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J. Biol. Chem.* **262**: 17229-303, 1987.
- Nakayama, T., Kaneko, M., Kodama, M., and Nagata, C. Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature* **314**: 462-4, 1985.
- Netto, L.E. and Stadtman, E.R. The iron-catalyzed oxidation of dithiothreitol is a biphasic process: hydrogen peroxide is involved in the initiation of a free radical chain of reactions. *Arch Biochem Biophys.* **333 (1)**: 233-242, 1996.
- Neumeister, J.A., and Webster, G.C. Changes in the levels and the rates of synthesis of transfer RNA in tissues of mice of different age. *Mech. Ageing Dev.* **16**: 319-326, 1981.
- Nicholas, T. and Redpath, N.T. high-resolution one-dimensional polyacrylamide gel isoelectric focusing of various forms of elongation factor-2. *Anal. Biochem.* **202**: 340-343, 1992.
- Nicholls, DG. in *Bioenergetics. An Introduction to the chemiosmotic theory* (Academic Press, London, New York), 1982

- Nilsson, L. and Nygård, O. Localization of the site of ADP-ribosylation and GTP binding in the eukaryot elongation factor EF-2. *Eur. J. Biochem.* **148**: 299-304, 1985.
- Noller, H.F. Structure of ribosomal RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **53**: 119-162, 1984.
- Nordquist, R.E., Nguyen, H., Poyer, J.L. and Carubelli, R. The role of free radicals in Paraquat-induced corneal lisions. *Free Radic Res.* **23(1)**: 61-71, 1995.
- Nygård, O; Nilsson, L. Kinetic determination of the effects of ADP-ribosylation on the interaction of eukaryotic elongation factor 2 with ribosomes. *J Biol Chem.* **265**: 6030-4, 1990.
- Nygård, O., and Nilsson, L. Translational dynamics. Interactions between the translational factors, tRNA and ribosomes during the eukaryotic protein synthesis. *Eur. J. Biochem.* **191**: 1-17, 1990.
- O'Connell, M.J. and Garner, A. Radiation induced generation properties of lipid hydroperoxide in liposomes. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **44**: 615, 1983.
- Ochi, H. The control of human aging. *JICA (Japan)*. 74-76, 1995.
- Ohno, T., Kako, R., Sato, C., and Ohkawa, A. Distinction of G<sub>0</sub> cells from senescent cells in cultures of non-cycling human fetal lung fibroblasts by anti-MAP-1 monoclonal antibody staining. *Exp. Cell. Res.* **163**: 309-316, 1986.

- Oliver, C.N., Moerman, E.J., Goldstein, S. and Stadtman, E.R. Age-related changes in oxidised proteins. *J. Biol. Chem.* **262**: 5488-5491, 1987.
- Olivier, C.N., Levine, R.L. and Standman, E.R. A role of mixed function oxidation reactions in the accumulation of altered enzyme forms during aging. *J. Am. Geriatr. Sci.* **35**: 947-956, 1987.
- Omura, F., Kohno, K. and Uchida, T. The histidine residue of codon 715 is essential for function of elongation factor 2. *Eur. J. Biochem.* **180**: 1-8, 1989.
- Orgel, L.E. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **49**: 517-521, 1963.
- Owenby, R.K., Stulberg, M.P., and Jacobson, K.B. Alteration of the Q family of transfer RNAs in adult *Drosophila melanogaster* as a function of age, nutrition, and genotype. *Mech. Ageing Dev.* **11**: 91-103, 1979.
- Pacifici, RE., Salo, DC., Davies, KJA. Macroxyproteinase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free Radicals Biol. Med.* **7**: 521, 1989.
- Packer, L. and Glazer, A.N., Oxygen Radicals in Biological Systems, "Part B" Oxygen Radicals and Antioxidants, eds: Methods in Enzymology. ACADEMIC PRESS, INC. vol: 186 p: 431-4438, 1990

- Parke, A. L. and Parke, D. V. Genetic and environmental aspects of drug metabolism relevant to side-effects in arthritic disease. In *Side-Effects of anti-Inflammatory Drugs*. Part. 1. (K. D. Rainsford and G.P. Velo, Eds.), pp. 241-257. MTP Press, Lancaster, 1987.
- Parks, D.A. and Granger, D.N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am. J. Physiol.* **250(6)**: 749-753, 1986.
- Parrado, J., Ayala, A. and Machado, A. Direct quantitative determination of peptides and proteins in PVDF transfer membranes using a computing densitometer. *Peptide Research*, **6**, 1: 13-16, 1993.
- Penden, D.B., Hohman, R.H., Brown, M.E., Mason, R.T., Berkebile, C., Fales, H.M. and Kaline, M.A. Uric acid is major antioxidant in human nasal airway secretions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7638-7642, 1990.
- Perentesis, J.P., Miller, S.P. and Bodley, J.W. Protein toxin inhibitors of protein synthesis. *BioFactors*. **3**: 173-184, 1992.
- Perentesis, J.P., Phan, L.D., Gleason, W.B., Laporte, D.C., Livingston, D.M. and Bodley, J.W. *Saccharomyces Cervisiea* elongation factor 2. *J. Biol. Chem.* **267**: 16751-16754, 1992.
- Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Paton, D., Sequeros, E. and Barja de Quiroga, G. Lung antioxidant enzymes,



- peroxidation, glutathione system and oxygen consumption in catalase inactivated young and old *Rana perezi* frogs. *Mech. Ageing Dev.* **56**: 281-292, 1990.
- Phan, L.D., Perentesis, J.P. and Bodley, J.W. *Saccharomyces cerevisiae* elongation factor 2. Mutagenesis of the histidine precursor of diphthamide yields a functional protein that is resistant to diphtheria toxin. *J Biol Chem.* **268 (12)**: 8665-8, 1993.
- Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R. and Marcheselli, F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* **55**: 271-276, 1994.
- Pierpoli, W. and Regelson, W. Pineal control of aging: Effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 787-791, 1994.
- Pierrefiche, C. and Laborit, H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Experimental Gerontology.* **30**: 213-227, 1995.
- Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Lisdero, C., Riobo, N., Schopfer, F. and Boveris, A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys.* **328(1)**: 85-92, 1996.
- Poot, M., Esterbauer, H., Rabinovitch, P.S. and Hoehn, H. Disturbance of cell proliferation by two model compounds of lipid peroxidation contradicts causative role in

- proliferative senescence. *J. Cell Physiol.* **137**: 421-429, 1988.
- Price, N.T., Redpath, N.T., Severinov, K.T., Campbell, D.G., Russell, R.J.M., and Proud, C.G. Identification of the phosphorylation sites in elongation factor-2 from rabbit reticulocytes. *FEBS Lett.* **282**: 253-258, 1991.
- Price, N.T., Redpath, N.T., Severinov, K.V., Campbell, D.G., Russell, J.M. and Proud, C.G. Identification of the phosphorylation sites in elongation factor-2 from rabbit reticulocytes. *FEBS Lett.* **282**: 253-8, 1991.
- Price, N.T., Welsh, G.L., Proud, C.G. Phosphorylation of only serine-51 in protein synthesis initiation factor-2 is associated with inhibition of peptide-chain initiation in reticulocyte lysates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**: 993-999, 1991.
- Rankin, P.W., Jacobson, E.L., Benjamin, R.C., Moss, J. and Jacobson, M.K. Quantitative studies of inhibitors of ADP-ribosylation in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* **264**: 4312-4317, 1989.
- Rao, G., Xia, E. and Richardson, A. Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F344 rats. *Mech. Ageing Dev.* **53**: 49-60, 1990.
- Rapp, G., Klaudiny, J., Hagendorff, G., Luck, M.R. and Scheit, K.H. Complete sequence of the coding region of human elongation factor 2 (EF-2) by enzymatic amplification of

- cDNA from human ovarian granulosa cells. *Biol. Chem. Hopper-Seyler*. **370**: 1071-1075, 1989.
- Rattan, S.I.S., Cavallius, J., Bhatia, P. and Clark, B.F.C. Protein elongation factor-1a in ageing rodent brain, in: K. Subba Rao and V. Prabhakar (Eds), *Aging - A Multifactorial Discussion*, Association of Gerontology (India), pp. 125-130, 1987.
- Rattan, S.I.S., Cavallius, J., Hartvigsen, G. and Clark, B.F.C. Activity and amounts of active elongation factor-1a in mice livers during ageing. *Trends Aging Res.* **147**: 135-140, 1986a.
- Rattan, S.I.S., Ward, W.F., Glenting, M., Svendsen, L., Riis, B., and Clark, B.F.C. Dietary calorie restriction does not affect the levels of protein elongation factors in rat livers during ageing. *Mech. Ageing Dev.* **58**: 85-91, 1991.
- Raychaudhuri, P., Stringer, E.A., Valenzuela, D.M., and Maitra, U. Evidence for a low molecular weight ribosomal subunit antiassociation protein factor (Mr = 25,000). *J. Biol. Chem.* **259**: 11930-11935, 1984.
- Razin, S., Pfendt, E.A., Matsumura, T., Hayflick, L. Comparison by autoradiography of macromolecular biosynthesis in 'young' and 'old' human diploid fibroblasts cultures: a brief note, *Mech. Ageing Dev.* **6**: 379-382, 1977.

- Redpath, NT; Proud, CG. Activity of protein phosphatase against initiation factor-2 and elongation factor-2. *Biochem. J.* **272**: 175-180. 1990.
- Redpath, NT; Proud, CG. The tumour promoter okadaic acid inhibits reticulocyte-lysate protein synthesis by increasing the net phosphorylation of elongation factor 2. *Biochem J.* **262**: 69-75, 1989.
- Reff, M.E. RNA and protein metabolism. In: Finch, C.E., and Schneider, E.L. (Eds) *Handbook of biology of aging*. Van Nostrand Reinold. New York. pp: 225-254, 1985.
- Reiter, R.J., Chen, L.D., Poeggeler, B.H., Barlow-Walden, L., Sewerynek, E. and Melchiorri, D. Antioxidant actions of melatonin and structurally related compounds. In: Cadenas, E., Packer, L. eds, *Handbook of antioxidants*. Marcel Dekker, New York. pp: 513-541, 1996.
- Reiter, R.J., Poeggeler, B., Chen, L-D., Manchester, L.C., Guerrero, J.M. antioxidant capacity of melatonin. A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol. Lett.* **15**: 103-116, 1993.
- Rhoads, R.E. Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factor. *J. Biol. Chem.* **268**: 3017-3020, 1993
- Richardson, A. The relationship between aging and protein synthesis. In J.R. Florini (de.), *Handbook of biochemistry in Aging*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 79-101, 1981.

- Richardson, A. The relationship between aging and protein synthesis, In: Florini, J.R. (Ed) *CDC Handbook of biochemistry in aging*, CRC Press Boca Raton, FL: 79-101, 1981.
- Richardson, A., and Semsei, Y. Effect of aging on translation and transcription. *Rev. Biol. Res. Aging.* **3**: 467-483, 1987.
- Richter, C., Park, J.W. and Ames, B.N. Normal oxidative damage and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6465-6467, 1988.
- Riis, B., Rattan, S.I., Clark, B.F., Merrick, W.C. Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem Sci.* **15 (11)**: 420-424, 1990.
- Riis, B., Rattan, S.I.S. and Clark, B.F.C. Estimating the amounts of ADP-ribosylable active elongation factor-2 in mammalian cell-free extracts. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **19**: 319-326, 1989a.
- Riis, B., Rattan, S.I.S. Cavallius, J. and Clark, B.F.C. ADPribosylable content of elongation factor-2 changes during cell cycle of normal and cancerous human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**: 141-1146, 1989b.
- Riis, B., Rattan, S.I.S., Cavallius, J. and Clark, B.F.C. ADP-ribosylable content of elongation factor-2 changes during cell cycle of normal and cancerous human cells. *Biochem. Biophys. Res. commun.* **159**: 1141-1146, 1989b.

- Riis, B., Rattan, S.I.S., Clark, B.F.C., and Merrick, W.C. Eukaryotic elongation factors. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 420-424, 1990.
- Riis, B., Suresh, Y. and Rattan S.I.S. The antibiotic fusidic acid inhibits ADP-ribosylation of protein elongation factor-2 in human cells. *Med. Sci. Res.* **24**: 21-222, 1995.
- Rivett, A.J. Preferential degradation of the oxidatively modified form of glutamine synthetase by intracellular mammalian proteases. *J. Biol. Chem.* **260**: 300-5, 1985.
- Roseman, J.E. and Levine, R.L. Roseman, J.E and Levine, R.L. Purification of a protease from *Escherichia coli* with specificity for oxidized glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **363**: 3203, 1987.
- Rosenberry, T.L., Krall, J.A., Dever, T.E., Haas, R., Louvard, D. and Merrck, W.C. Biosynthetic incorporation of [<sup>3</sup>H]Ethanolamine into protein synthesis elongation factor EF-1 alpha reveals a new posttranslational protein modification. *J. Biol. Chem.* **264**: 7096-7099, 1989.
- Rowley, D., Gutteridge, J.M.C., Blake, D., Farr, M. and Halliwell, B. Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: Thiobarbituric acid reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clin. Sci.* **66**: 691-695, 1984.

- Ryazanov, AG; Shestakova, EA; Natapov, PG. Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation. *Nature*. **334**: 170-3, 1988.
- Sacchi, GA; Zocchi, G; Cocucci, S. Changes in form of elongation factor 1 during germination of wheat seeds. *Eur J Biochem*. **139**: 1-4, 1984.
- Sahakian, J.A., Szweda, L.I., Friguet, B., Kitani, K. and Levine, R.L. Aging of the liver: proteolysis of oxidatively modified glutamine synthetase. *Arch Biochem Biophys*. **318**: 411-417, 1995.
- Schneider, E.L., and Shorr, S.S. alteration in cellular RNAs during the in vitro lifespan of cultured human fibroblasts. *Cell*. **6**: 179-195, 1975.
- Schneider, E.L., Mitsui, Y., Tice, R., Shorr, S.S., and Braunschweiger, K. Alteration in cellular RNAs during the in vitro lifespan of cultured human diploid fibroblasts. II. Synthesis and processing of RNA. *Mech. Ageing Dev*. **4**: 449-457, 1975.
- Schulz, J.B., Henshaw, D.R., Mattews, R.T. and Beal, M.F. Coenzyme Q10 and nicotinamide and a free radical spin trap protect against MPTP neurotoxicity. *Exp. Neurol*. **132**: 279-283, 1995.
- Schuman, E.M., Meffert, M.K., Schulman, H. and Madison, D.V. An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric

- oxide action in hippocampal long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 11958-11962, 1994.
- Scornick, O.A. "In vivo" rate of translation by ribosomes of normal and regenerating liver. *J. Biol. Chem.* **249**: 3876-3883, 1974.
- Scornik, O.A. "In vivo" rate of translation by ribosomes of normal and regenerating liver. *J. Biol. Chem.* **249**: 3876-3883, 1974.
- Shakespeare, V., and Buchanan, J.H. increased degradation rates of protein in aging human fibroblasts and in cells treated with an amino acid analog. *Exp. Cell Res.* **100**: 1-8, 1976.
- Shal, R.S. and Dubey, A. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Rad. Biol. Med.* **16**: 621-626, 1994.
- Sharma, S.P., and Rai, N. Amino acid variation during ageing of *Callasobruchus maculatus* Fabr. (Coleoptera). *Zool. Orient.* **1**: 26-29, 1984.
- Sherwood, S.W., Rush, D., Ellsworth, J.L., and Schimke, R.T. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **85**: 9086-9090, 1988.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. and Ames, B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 10771-10778, 1994.



- Shimura, J., Shimura, F. and Hosoya, N. Functional disability of rat splenocytes provoked to lipid peroxidation by cumene peroxide. *Biochim. Biophys. Acta.* **845**: 43-47, 1985.
- Sies, H. and Summer, K.-H. Hydroperoxide metabolizing system in rat liver. *Eur. J. Biochem.* **57**: 503-512, 1975.
- Sims, J.L., Berger, S.J. and Berger, N.A. Poly(ADP-ribose) Polymerase inhibitors preserve nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine 5'-triphosphate pools in DNA-damaged cells: mechanism of stimulation of unscheduled DNA synthesis. *Biochemistry.* **22**: 5188-5194, 1983.
- Sitikov, A.S., Davydova, E.K. and Ovchinnikov, L.P. Endogenous ADP-ribosylation of elongation factor 2 in polyribosome fraction of rabbit reticulocytes. *FEBS Lett.* **176 (1)**: 261-3, 1984.
- Sitikov, A.S., Davydova, E.K., Bezlepkina, T.A., Ovchinnikov, L.P. and Spirin, A.S. Eukaryotic elongation factor 2 loses its non-specific affinity for RNA and leaves polyribosomes as a result of ADP-ribosylation. *FEBS Lett.* **176 (2)**: 406-10, 1984.
- Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Standman E.R., Floyd R.A. and Markesbery W.R. Excess brain protein oxidation and enzyme disfunction in normal aging and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* **88**: 10540-10553, 1991.

- Sohal R., Arnold L.A. and sohal B.H. Age-related changes in antioxidant enzymes and peroxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Radical Bio. Med.* **10**: 495-500, 1990b.
- Sohal R., Arnold L.L. and Orr W.C. Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP<sup>+</sup> in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **56**: 223-235, 1990a.
- Sohal, R.S. and Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* **273 (5271)**: p59-63 1996.
- Sohal, R.S. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging Clin. Exp. Res.* **5**: 3-17, 1993.
- Söll D. The accuracy of aminoacylation-ensuring the fidelity of the genetic code. *Experientia.* **46**: 1089-1096, 1990.
- Sontag, B., Reboud, A., Divita, G., Di Pedro, A., Guillot, D. and Reboud, J. Intrinsic Tryptophan fluorescence of rat liver elongation factor eEF-2 to monitor the interaction with Guanylic and Adenylic nucleotides and related conformational changes. *Biochem.* **32**: 1976-1980, 1993.
- Stadtman E.R. and Wittenberg M.E. Inactivation of *E. coli* glutamine synthetase by xanthine oxidase, nicotinate hydroxylase, horseradish peroxidase or glucose oxidase:

- effects of ferredoxin, putaredoxin and menadione. *Arch. Biochem. Biophys.* **239**: 379-387, 1985.
- Stadtman E.R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 797-821, 1993.
- Stadtman E.R. Oxidation of protein by mixed-function system: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 11-12, 1986.
- Stadtman E.R. Protein oxidation and aging. *Science* **257**: 1220-1224, 1992.
- Stancampiano R, Melis MR, Fratta W and Argiolas A. Brain proteolysis of oxytocin in vitro and in vivo changes during aging in male rats. *Neurobiol Aging.* **15**: 185-9, 1994.
- Starke-Reed P.E. and Oliver C.N. and Standman E.R. Modification of hepatic proteins in rats exposed to high oxygen concentration. *FASEB J.* **1**: 36-39, 1987.
- Starke-Reed P.E. and Oliver C.N. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**: 559-567, 1989.
- Sun Y. Free radicals, antioxidants enzymes and carcinogenesis. *J. Free Rad. Biol. Med.* **8**: 583-599, 1990.
- Taffe B.G., Takahashi, N., Kensler, T.W. and Mason, R.P. Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes: Formation

- of alkyl and alkoxy radicals from ter-butyl hydroperoxide and cumene hydroperoxide. *J. Biol. Chem.* **262**: 12143-12149, 1987.
- Takahashi R., Mori N., and Goto S. Accumulation of heat-labile elongation factor 2 in the liver of mice and rats. *Exp. Gerontol.* **20**: 325-331, 1985b.
- Takahashi R., Mori N., and Goto S. Alteration of aminoacyl tRNA synthetases with age. Accumulation of heat-labile molecules in rat liver, kidney and brain. *Mech. Ageing Dev.* **33**: 67-75, 1985a.
- Tan D-X., Chen L-D., Poeggeler B., Manchester L.C., Reiter R.J. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* **1**: 57-60, 1993.
- Tanaka H., Zaitzu H., Onodero K., and Kimura G. Influence of the deprivation of a single amino acid on cellular proliferation and survival in rat 3Y1 fibroblasts and their derivatives transformed by a wide variety of agents. *J. Cell. Physiol.* **136**: 421-430, 1988.
- Taylor A and Davies K.J.A. Protein oxidation and loss of protease activity may lead to cataract formation in the aged lens. *Free Radic Biol Med.* **3 (6)**: 371-7, 1987.
- Towbin J., Staehelin T. and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354, 1979.

- Turrens J.F., and Boveris A. Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* **191**: 421-424, 1980.
- Tyler D.D. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem. J.* **147**: 493-504, 1975.
- Ueda K. and Hayaishi O. ADP-ribosylation. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 73-100, 1985.
- van Damme H.T.F., Amons R., Karssies R., Timmers C.J., Janssen G.M.C. and Möller W. Elongation factor 1 $\beta$  of artemia; localization of functional sites and homology to elongation factor 1 $\delta$ . *Biochimica Biophysica Acta.* **1050**: 241-247, 1990.
- Van Ness B.G., Howard J.B., and Bodley J.W. ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **255**: 10710-10716, 1980.
- Vargas R., Castañada M. Age-dependent decrease in the activity of protein-synthesis initiation factors in rat brain. *Mech. Ageing Dev.* **21**: 183-191, 1983.
- Wang, E. and Cortopassi, G. Mice with duplications and deletions at the Tme locus have altered Mn SOD activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 22463-22465, 1994.
- Webster G.C. Effect of aging on the components of the protein synthesis system. **In:** Collatz K.G., and Sohal R.S. (Ed) *Insect aging*, Springer, Berlin, **pp**: 207-216, 1986.

- Webster G.C. Protein synthesis in aging organisms. In: Sohal R.S., Birnbaum L.S., R.G. Cutler R.G. (Eds): *Molecular Biology of aging: Gene Stability and Gene Expression*, Raven, New York, pp: 263-289, 1985.
- Webster G.C., and Webster S.L. Aminoacylation of tRNA by cell-free preparations from aging *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* **16**: 487-494, 1981.
- Webster G.C., Webster S.L., and Landis W.A. The effect of age on the initiation of protein synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing dev.* **16**: 71-79, 1981.
- Webster, G.C. and Webster, S.L. Decreased protein synthesis by microsomes from aging *drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* **14**: 343-348, 1979.
- Webster, G.C. and Webster, S.L. Effect of age on the post-initiation stages of protein synthesis. *Mech. Ageing Dev.* **18**: 369-378, 1982.
- Williams, G.C. Pleitropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution.* **11**: 398-411, 1957.
- Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature.* **294**: 284-286, 1981.
- Yoshihara K., Tsuyuki M., Itaya A., Tanaka Y. and Kamiya T. 3-aminobenzamide, a potent inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase, causes a rapid death of HL-60 cells cultured

- in serum-free medium. *Mol Cell Biochem.* **135 (2)**: 143-151, 1994.
- Yu, B.P. and Yang, R. Critical evaluation of the free radical theory of aging: A proposal for the oxidative stress hypothesis. *Ann N Y Acad Sci.* **786**: 1-11, 1996.
- Yu, B.P. and Yang, R. Critical evaluation of the free radical theory of aging: A proposal for the oxidative stress hypothesis. *Ann N Y Acad Sci.* **786**: 1-11, 1996.
- Yu, B.P. Need the free radicals theory of aging be linked to the metabolic rate theory? *Aging Clin. Exp. Res.* **5**: 243-244, 1993.
- Yu, B.P. Need the free radicals theory of aging be linked to the metabolic rate theory? *Aging Clin. Exp. Res.* **5**: 243-244, 1993.
- Zhang J., Dawson V.L., Dawson T.M. and Snyder S.H. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science.* **263**: 687-689, 1994.
- Zhang, J. and Snyder, S. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 9382-9385, 1992.
- Zhou, H., Huiatt, T.W., Robson, R.M., Sernett, S.W. and Graves, D.J. Characterization of ADP-ribosylation sites on desmin and restoration of desmin intermediate filament assembly by ADP-ribosylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **334**: 214-222, 1996.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. Mohammed Bougna  
titulada Síntesis de Proteínas y Envejecimiento:  
Papel de los Radicales Libres.

acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente "Cum Laude"  
Apto (Cum Laude)

Sevilla, 12 de Diciembre 1997

El Vocal,

Juan Bautista  
Pobocua

El Vocal,

Alfonso Ayuso

El Vocal,

Navia Tapasco

El Secretario,

Juan Ferrer

El Doctorado,

Juan

Josefa Can