

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS,  
QUÍMICAS Y NATURALES DE ZARAGOZA

**PROGRESOS EN GENÉTICA HUMANA  
DEL ENVEJECIMIENTO Y LONGEVIDAD**

*DISCURSO DE INGRESO LEÍDO POR EL ACADÉMICO ELECTO*

**Ilmo. Sr. D. MANUEL TAMPARILLAS SALVADOR**

*EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN SOLEMNE  
CELEBRADO EL DÍA 12 DE MAYO DEL AÑO 2005*

Y

*DISCURSO DE CONTESTACIÓN POR EL*

**Ilmo. Sr. D. HORACIO MARCO MOLL**

*PRESIDENTE*



ZARAGOZA

2005

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS,  
QUÍMICAS Y NATURALES DE ZARAGOZA

**PROGRESOS EN GENÉTICA HUMANA  
DEL ENVEJECIMIENTO Y LONGEVIDAD**

*DISCURSO DE INGRESO LEÍDO POR EL ACADÉMICO ELECTO*

**Ilmo. Sr. D. MANUEL TAMPARILLAS SALVADOR**

*EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN SOLEMNE  
CELEBRADO EL DÍA 12 DE MAYO DEL AÑO 2005*

Y

*DISCURSO DE CONTESTACIÓN POR EL*

**Ilmo. Sr. D. HORACIO MARCO MOLL**

*PRESIDENTE*



ZARAGOZA

2005

Depósito legal: Z. 1.181 - 2005

*Imprime:*

Sdad. Coop. de Artes Gráficas  
LIBRERÍA GENERAL  
Pedro Cerbuna, 23  
50009 Zaragoza  
imprentalg@efor.es

**PROGRESOS EN GENÉTICA HUMANA  
DEL ENVEJECIMIENTO Y LONGEVIDAD**

**POR EL**

**Ilmo. Sr. D. MANUEL TAMPARILLAS SALVADOR**

**Excmos. e Ilmos. Sres.,**

**Señoras y señores:**

Ha sido para mí una gran emoción y una agradable sorpresa haber sido nombrado Académico numerario de esta Ilustre Corporación de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza. Quiero expresar mi agradecimiento al Excmo. Sr. Presidente y a todos los Ilmos. Sres. académicos, muy especialmente a los Dres. Horacio Marco y Ángel García de Jalón.

Este nombramiento me ha supuesto una agradable sorpresa por cuanto que mi vida profesional, dedicada a la Genética Humana y Clínica, ha consistido preferentemente en una labor asistencial en la Sanidad pública. Mis contactos docentes con la Universidad han sido ciertamente continuados y a este respecto quiero recordar a mi profesor Dr. Ramón Rey Ardid con quien participé durante el decenio de los 70 en un Curso de Doctorado bajo el título de Genética Psiquiátrica. Igualmente a las cátedras de Pediatría de la Facultad de Medicina, a la cátedra de Biología de dicha Facultad, a la cátedra de Genética y Mejora Animal de la Facultad de Veterinaria, entre otras. Igualmente quiero señalar que la Facultad de Medicina ha incluido la asignatura de Genética a partir de este curso docente 2004-2005, quizá por la relevancia que a su juicio ha alcanzado en los últimos 50 años. Mejor recuerdo he guardado de las numerosas Tesis doctorales que he tenido la suerte de dirigir o de participar en sus tribunales.

En mi actividad profesional he tenido la gran fortuna de contar con buenos colaboradores y amigos, con los que hemos formado la Sección de Genética Humana del Hospital Universitario "Miguel Servet" de la Seguridad Social de Zaragoza, en su andadura de más de 35 años. En este punto quiero referirme al papel tan señalado que nuestra Ciudad ha tenido en el campo de la Genética Humana. El primero realizado por D. Santiago Ramón y Cajal sobre la masa de cromatina en los núcleos de neuronas de felinos hembras, que posteriormente fue denominada masa de BARR, indicativa de la inactivación de uno de los

cromosomas X. Aquel descubrimiento supuso en la era pre-citogenética poder diagnosticar varias gonosomopatías humanas, como los síndromes de TURNER y de KLINEFELTER. Sin embargo la principal aportación fue la realizada en 1956 por el Dr. Tjio en el Centro Experimental de la Cartuja de Aula Dei, al demostrar que el complemento cromosómico humano constaba de 46 elementos, 44 autosomas y dos cromosomas sexuales. Fue el comienzo de la Citogenética Humana, del estudio de las alteraciones cromosómicas constitucionales y adquiridas y del "mapeo" de los genes en las distintas bandas cromosómicas.

Soy consciente de la suerte que he tenido al haber podido seguir los adelantos de la Genética Humana desde sus inicios, aprendiendo las técnicas de cultivo celular con el Dr. Forteza Bover en Valencia, el cultivo de tumores con el Dr Freshley en Escocia, el diagnóstico prenatal con el Dr Kurt Hirschhorn en el Monte Sinaí de Nueva York, etc. Sobre estas bases he podido desarrollar mi actividad en Genética Humana, inicialmente en el Servicio de Hematología que dirigía el Dr Raichs Solé y seguidamente y sin interrupción en el Servicio de Bioquímica que actualmente dirige el Dr García de Jalón.

Quiero destacar el papel multidisciplinar que se ha propuesto esta Academia, con la asignación de una nueva medalla, la nº 34, con la que acoge una nueva disciplina, la Genética Humana, que tanta trascendencia ha alcanzado en la actualidad, iniciando una relación con el resto de Ciencias de las que precisamente ha de beneficiarse.

El tema del discurso que voy a presentar lleva por título "*Progresos en Genética Humana del envejecimiento y longevidad*"; dada su actualidad, la repercusión en la sociedad actual y porque es motivo de nuestro estudio en el Centro de Análisis Genéticos de nuestra ciudad, con la estimable ayuda del Dr Manuel López, catedrático de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Espero y deseo que su exposición, resultados y conclusiones merezcan el honor que me habéis otorgado.

El término de Gerontología fue introducido en 1903 por METCHNIKOFF para designar el estudio científico del proceso del envejecimiento de los seres vivos. Referido al hombre, la Gerontología incluye actualmente aspectos sociológicos, psicológicos y económicos a los que ha de enfrentarse la Sociedad actual, como importantes problemas derivados de la cambiante constitución de la humanidad. La Biogerontología ha surgido con fuerza inusitada en los últimos años, creándose numerosos grupos de trabajo e investigación en numerosos países.

El hombre en la actualidad ha desechado la quimera de la inmortalidad y se ha centrado en conseguir una mayor supervivencia con mejores condiciones físicas y mentales. Los hábitos saludables de vida, la adecuada nutrición, los progresos en el diagnóstico precoz de numerosas enfermedades y el tratamiento de muchas de ellas, han logrado duplicar la expectativa de vida en los últimos cien años de existencia de la especie. La longevidad o ciclo vital se refiere a la duración máxima posible de la vida del hombre que, por acuerdo unánime científico, se ha cifrado en los 120 años. La esperanza o expectativa de vida es simplemente un concepto estadístico que señala la edad que el 50% de individuos puede llegar a alcanzar en un momento determinado, dentro de su agrupación y situación de vida.

Los avances científicos en el pasado siglo han sido definitivos para prevenir y tratar eficazmente ciertos procesos desfavorables, tales como las infecciones, la recuperación de los traumatismos, las deficiencias nutricionales, etc., lo que ha permitido aflorar una alta proporción de enfermedades y predisposiciones de base genética o hereditaria. En este proceso, los factores ambientales han sido segregados de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento y de los mecanismos biológicos que conducen naturalmente a este proceso. El estudio del envejecimiento se circunscribe al hombre, a los animales domésticos y a animales de experimentación en los que se pueden modificar los factores ambientales de su habitat.

Desde el inicial descubrimiento por GARROT en 1902 de la alcaptonuria y la demostración de que dicha enfermedad cumplía las leyes de MENDEL, se ha venido produciendo un vertiginoso desarrollo de la Genética Humana, principalmente en dos áreas: la investigación de la variación genética asociada a cada una de las enfermedades hereditarias y el empleo de dicha variación para el conocimiento de los orígenes del hombre y de su evolución prehistórica. Ambas áreas, con objetivos diferentes, aprovechan las mismas fuentes

de estudio y muestran idénticos problemas a resolver.. El estudio del proceso genético del envejecimiento y de la longevidad se sitúan entre ambas áreas de investigación y son en la actualidad campos muy estudiados por las repercusiones socio-económicas que se plantean en países desarrollados.

A diferencia de los éxitos conseguidos en las enfermedades monogénicas en las que se ha llegado al conocimiento del gen causal y de las mutaciones más frecuentes, aquellas otras multifactoriales o poligénicas siguen siendo centro de numerosos estudios. Estas enfermedades son las más frecuentes en la población, como por ejemplo la obesidad, la diabetes, la hipertensión y, por supuesto, el envejecimiento, en las que existe una interrelación de los loci para rasgos cuantitativos (QTL), de etiología heterogénea y con participación importante de los factores ambientales. En vista de estas dificultades es preciso recurrir a estrategias especiales que pongan de relieve mínimas variaciones genéticas causantes de los fenotipos cuantitativos. Por ello, si bien se han hecho ciertas objeciones a los estudios estereotipados en agrupaciones humanas en base a razas, lenguaje, etnias, nacionalidades, etc., son de destacar los éxitos conseguidos al poder demostrar polimorfismos propios en muchas de ellas. Las poblaciones que exhiben un rasgo geográfico y que suponen una limitación de la migración tradicional, permiten identificar diferencias en genes específicos que han persistido frente a la deriva, a mutaciones y polimorfismos y a la selección<sup>1</sup>. Hay que señalar que únicamente el fenotipo es el objeto directo de la selección que puede haberse producido en determinadas poblaciones y que se olvida con frecuencia que la selección no radica en la correcta secuencia de un gen determinado, sino que se trata de una situación tolerante que, dentro del proceso del envejecimiento, permite la posibilidad de una supervivencia relativa. Evidentemente los genes vitales, los implicados en la embriogénesis o los implicados en interacciones pleiotrópicas son muy poco variables y por la misma razón no serían responsables de enfermedades de presentación tardía. Hay que admitir, por tanto, que son los fenotipos más que los genotipos los que provocan la evolución de la relación Genotipo/Fenotipo entre y dentro de las distintas poblaciones sometidas a la acción de factores ambientales.

La investigación sobre el envejecimiento ha sido objeto de amplios estudios en los últimos 30 años, mientras que la investigación de la longevidad es más reciente, quizá de los últimos 10 años. En el envejecimiento los avances se centran en la discriminación de las enfermedades relacionadas con la edad<sup>2</sup>, mientras que en la longevidad el soporte genético en su determinación queda demostrado por el estudio gemelar llevado a cabo en los países escandinavos<sup>3</sup> y por estudios clínicos familiares<sup>4</sup>.

El fallo en distinguir entre las investigaciones sobre el envejecimiento, propias de la Biogerontología y la búsqueda de las enfermedades asociadas con la edad, propias de la Geriátrica, ha sido y sigue siendo una constante fuente de confusión. El envejecimiento no puede ser considerado propiamente como una enfermedad y hay que distinguirlo de las causas de muerte en edad avanzada, tales como las enfermedades cardiovasculares, el ictus cerebral, y el cáncer, cuya prevención demuestra que la expectativa de vida se haya incrementado en países desarrollados en más de 15 años en los últimos cinco lustros.

Para el público en general y para ciertos científicos nadie moriría por el envejecimiento, sino que la muerte se debería a enfermedades asociadas al mismo. Por el contrario, el envejecimiento debe ser considerado como un proceso natural que tiene lugar después de la maduración reproductiva y que es el resultado de la disminución de la energía capaz de mantener la fidelidad celular. Incluso cabría pensar que el envejecimiento no sería programado y directamente gobernado por genes, tal como podría deducirse del fracaso relativo en su identificación, llevada a cabo en diversos animales de experimentación.

La Biogerontología, producto de las investigaciones sobre la longevidad, tendría como misión no tanto lograr una mayor expectativa de vida en el hombre, sino conseguir que alcanzase una vida libre de discapacidades y de dependencia funcional. Hasta hace unos pocos años, la Biogerontología ha sido una laguna dentro de la Biología Humana y el lento progreso en el análisis cuantitativo y cualitativo de la longevidad va desentrañando dicho conocimiento, aunque sin olvidar la importancia de las influencias ambientales<sup>5</sup>.

Retomando el tema del envejecimiento, hay que señalar que este término se emplea habitualmente para hacer referencia a los procesos postmadurativos que conducen a una disminución de la homeostasia y a un incremento de la vulnerabilidad del organismo. El término alternativo de vejez resultaría ser más correcto. El proceso de envejecimiento "normal" incluye cambios fisiológicos inexorables y universales, mientras que el envejecimiento "ordinario" comprende aquellas patologías relativas a la edad. Un ejemplo para comprender esta distinción vendría dado por la menopausia y por el declinar en la función renal, circunstancias propias del envejecimiento normal, frente a la enfermedad arterial coronaria que sería un proceso habitual del envejecimiento, pero que no tiene por qué presentarse en toda la población envejecida. Esta separación permite, además, identificar causas intrínsecas, propias del desarrollo genético, de las causas externas, sin que por ello se les reste importancia. No cabe duda de que la alteración de la homeostasia en el organismo envejecido es el resultado de una consecuencia genética que determina la respuesta del

individuo frente a las influencias exógenas y, por ello, aumenta la predisposición a diferentes patologías y a la muerte<sup>6</sup>.

Se define la esperanza media de vida como la edad en que sobrevive el 50% de una población, y el potencial máximo de supervivencia (MLSP) representa a aquellos miembros vivos de mayor edad de una población o de una especie definida. En el hombre, la expectativa de vida se ha incrementado notablemente y el potencial máximo de supervivencia se ha llegado a establecer entre los 90 y 100 años. Así, hace 50.000 años raramente se llegaban a sobrepasar los 40 años de vida, de forma que las medidas adoptadas por la sociedad moderna sobre salud pública y los mejores cuidados médicos han contribuido a la mayor supervivencia de la población (Figura 1).

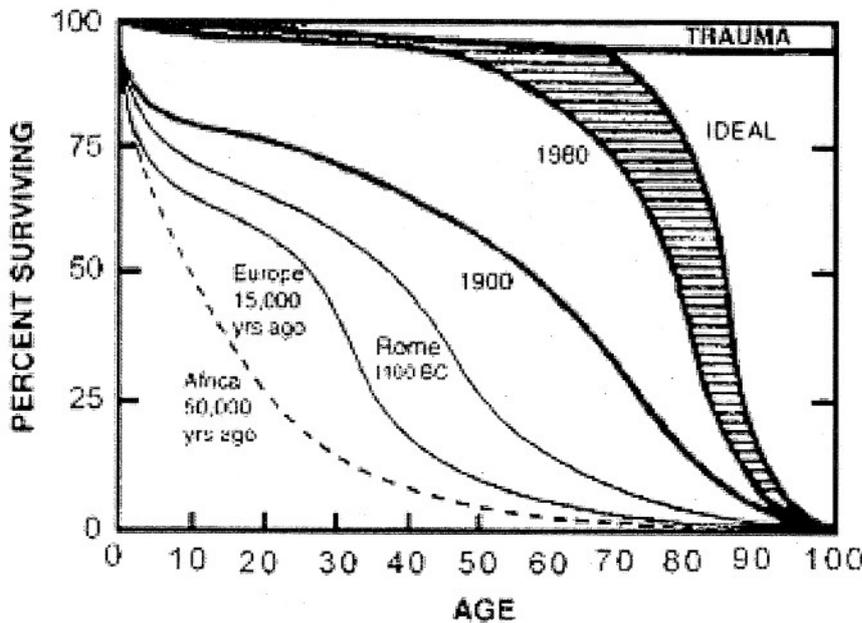


Figura 1. Modificada de CUTLER RG (1990).

La supervivencia parece ser específica de cada especie, implicando un componente genético significativo que haría que el hombre tenga una supervivencia de 25 a 30 veces mayor que el ratón (Figura 2). Ciertos investigadores<sup>8</sup> estiman que la eliminación de las principales causas de muerte, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares o la

diabetes, no supondrían tan siquiera un incremento en 10 años en la supervivencia, quedando el límite de la especie humana en torno a 115 años.

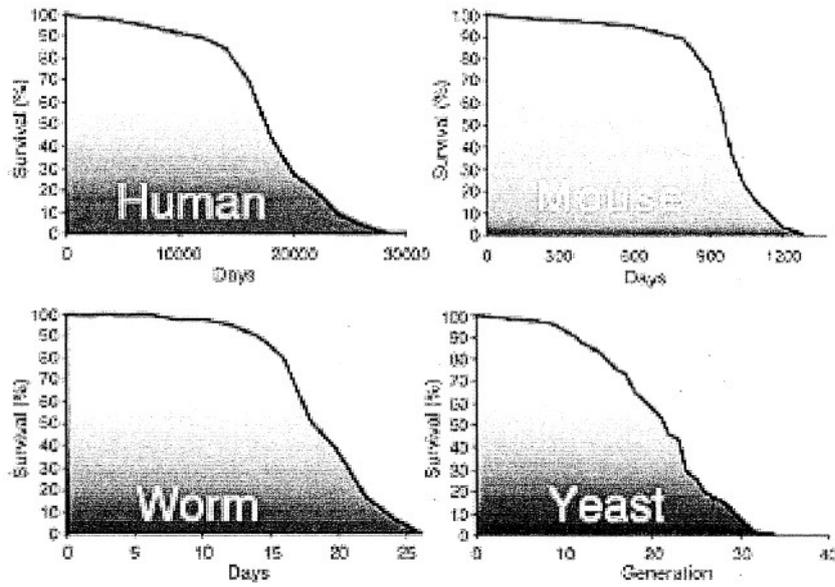


Figura 2.

Existen tres regímenes conocidos que pueden incrementar la expectativa de vida animal. Los dos primeros, el descenso de la temperatura ambiental y la reducción de la actividad, son especialmente efectivos en animales de sangre fría. El descenso en un 10% de la temperatura ambiente, o bien la eliminación de la capacidad del vuelo en la mosca común, incrementan la expectativa de vida en un 250%. Ambas modificaciones consiguen rebajar el consumo metabólico y se acompañan de un descenso en la producción de radicales libres y del daño oxidativo que puedan sufrir las proteínas y el ADN. Por otro lado, la restricción en la dieta, sin que llegue a existir malnutrición, incrementa la expectativa de vida en el ratón y en otros roedores en más del 50%. Los animales sometidos a esta restricción, manteniendo los nutrientes esenciales tanto vitaminas como minerales, muestran un retraso en la aparición de los cambios fisiológicos y patológicos propios del envejecimiento, entre los que se incluyen los niveles hormonales y lipídicos, la capacidad reproductora de las hembras, la función inmune y otras alteraciones como una menor patología renal, cardíaca, del sistema osteoarticular y una reducción de la tendencia a sufrir procesos malignos. En animales superiores, como los monos, la restricción calórica tiende a reducir la temperatura corporal y el gasto de

energía. Igualmente incrementa la tasa sérica de lipoproteínas de alta densidad y retrasa el declinar postmadurativo. Los estudios en humanos no llegan a ser tan concluyentes.

#### **Características del envejecimiento:**

El envejecimiento se caracteriza por una serie de alteraciones orgánicas que han sido minuciosamente analizadas, buscando en cada una de ellas las modificaciones fenotípicas que pudieran estar controladas genéticamente y que principalmente en los mamíferos son:

- a) Incremento de la mortalidad después de la madurez
- b) Cambios en la composición bioquímica de los tejidos
- c) Descenso progresivo de la capacidad fisiológica
- d) Reducción de la respuesta adaptativa a los estímulos ambientales
- e) Aumento de la susceptibilidad y vulnerabilidad frente a las enfermedades.

#### **a) Incremento de la mortalidad después de la edad adulta**

Se demuestra un incremento exponencial de la mortalidad, después de haber alcanzado la edad adulta, debido a varias causas, que se ha mantenido a través de las múltiples generaciones hasta la actualidad, afectando a todas las especies.

#### **b) Cambios en la composición bioquímica de los tejidos**

Con la edad se produce un notable descenso de la masa corporal y de la masa ósea total, y si bien la cantidad de grasa subcutánea no se halla alterada o descendida, la grasa total permanece siendo la misma. El porcentaje de tejido adiposo, en consecuencia, aumenta con la edad. A nivel celular se han descrito muchos marcadores propios del envejecimiento en varios tejidos de diferentes especies, entre éstos un aumento del pigmento lipofucsina y un incremento del ligamiento cruzado de las moléculas de la matriz extracelular, en especial del colágeno, con alteración de la plasticidad de numerosos tejidos. Otros ejemplos se refieren a las tasas de transcripción de genes específicos y a la tasa de la síntesis proteica, con modificaciones en la glucólisis y en la oxidación.

### **c) Descenso progresivo de la capacidad fisiológica.**

Existen numerosos trabajos bien documentados, tanto longitudinales como sectoriales, que demuestran cambios fisiológicos relativos a la edad, como por ejemplo un descenso en la tasa de filtración glomerular, alteraciones en la tensión arterial y en la función cardiaca y un descenso en la capacidad vital. Estas modificaciones ocurren de forma lineal a partir de los 30 años de edad en el hombre, aunque con frecuencia son heterogéneas de órgano a órgano y de individuo a individuo.

### **d) Reducción de la capacidad de adaptación a estímulos ambientales.**

Resulta evidente que la edad disminuye la capacidad del individuo para mantener la homeostasia en ciertas situaciones como el ejercicio y frente a ciertos hábitos alimenticios. El individuo joven compensa el ejercicio incrementando el ritmo cardiaco, mientras que el senecto sufre una hipertrofia del miocardio. Esta pérdida de reservas supone un cierto retraso en volver a adquirir los niveles basales.

### **e) Aumento de la susceptibilidad y vulnerabilidad frente a las enfermedades.**

La incidencia y las tasas de mortalidad para muchas enfermedades aumenta con la edad y de forma paralela existe un incremento exponencial. Para las cinco causas principales de muerte a partir de los 65 años de edad, el incremento relativo respecto a las observadas entre los 25 - 44 años son las siguientes: 92 veces para las cardiopatías; 43 veces para el cáncer; más de 100 para los ictus y 89 veces para la neumonía y la gripe. Posiblemente estos incrementos se deban a cambios funcionales de las células, que originan una disfunción tejido-órgano y un proceso sistémico. Es de notar que los individuos centenarios muestran buen estado de salud durante el 90 - 95% de su vida, con un elevado nivel de independencia.

### **Teorías evolutivas del envejecimiento y de la longevidad.**

Desde tiempos antiguos ha existido un creciente interés en exponer una teoría general que consiga explicar en que consiste el envejecimiento y como se llega a producir. Esta posible teoría alcanza un importante interés científico, ya que permitiría ensamblar las numerosas aportaciones científicas que se vienen realizando en una lógica cadena de acontecimientos propios del proceso del envejecimiento y de la longevidad que hemos presentado anteriormente. Una gran mayoría de investigadores deducen que dicha teoría ha de

fundamentarse en la evolución biológica debida a la selección natural, que conformaría el "núcleo intelectual" de la Gerontología<sup>9</sup>.

Las bases lógicas de las teorías evolutivas se establecieron a partir de 1950, un siglo después de que DARWIN expusiera la teoría de la evolución biológica, debido a que durante este periodo el proceso del envejecimiento se consideró como un fenómeno misterioso y no relacionado con la teoría clásica de la selección natural. Esta teoría, como es sabido, se fundamenta en la idea de la variación por el azar y por la transmisión hereditaria de los aquellos rasgos biológicos que por selección natural supusiesen la reproducción preferente de individuos de una especie que resultasen más adecuados frente a un determinado ambiente.. De ahí que se espere y que se observe que la evolución biológica actúe para incrementar la adaptación y el rendimiento de las especies evolucionadas en sucesivas generaciones. La senectud y las enfermedades degenerativas de la edad adulta no encajarían en el espíritu inicial de la teoría darwiniana.

La problemática de la evolución biológica del envejecimiento fue estudiada inicialmente en un plano teórico y no experimental por numerosos científicos:

August WEISMANN en 1882

Ronald FISHER en 1930

Peter MEDAWAR en 1946

George WILLIAMS en 1957

William HAMILTON en 1966

Brian CHARLESWORTH en 1994

Las teorías evolutivas comenzaron a poder ser comprobadas en experimentos directos realizados en ciertas especies como gusanos y moscas, demostrando que el envejecimiento y la vida media de dichos organismos evolucionan en las siguientes generaciones en una dirección teóricamente determinada, dependiendo de las condiciones particulares de vida. Así, se puede demostrar en la mosca de la fruta que una selección para la reproducción tardía producía, tal como se esperaba, unos animales de vida más prolongada, mientras que colocando estos animales en un ambiente más perjudicial se reducía la expectativa de vida en las siguientes generaciones<sup>10</sup>.

La teoría evolutiva del envejecimiento podría considerarse como parte del proceso de evolución que explicase cómo los organismos alcanzan una reproducción adecuada que evite su extinción. Comparando unas especies con otras surgen numerosas cuestiones:

¿Por qué existen organismos grandes y pequeños?

¿Por qué unos maduran precozmente y otros lo hacen tan tarde?

¿Por qué unos tienen tanta progenie y otros tan poca?

¿Por qué unos tienen una vida tan larga y otros tan corta?

¿Por qué es necesario crecer, envejecer y morir?

Las dos últimas preguntas forman el centro de la teoría evolutiva del envejecimiento y son los temas prioritarios de la biodemografía del envejecimiento y de la longevidad. Su contestación vendría dada por dos teorías principales, la teoría de la acumulación de mutaciones y la teoría de la pleiotropía antagónica, que se sintetizan en:

- a) La teoría de la acumulación de mutaciones sugiere que desde un punto de vista evolutivo, el envejecimiento es el resultado inevitable de la fuerza decreciente de la selección natural ocasionada por el incremento de la edad. Las mutaciones letales que se manifiestan en individuos jóvenes, sufren una selección natural en las especies, mientras que aquellas otras de aparición tardía, sobrepasada la edad de procreación, se irían acumulando, produciendo a la larga un incremento de las tasas de mortalidad.
- b) La teoría de la pleiotropía antagónica sugiere que los genes con efectos deletéreos tardíos pueden verse favorecidos por la selección natural, en especial si tuvieron efectos beneficiosos tempranos.

Ambas teorías no se excluyen mutuamente y los mecanismos evolutivos pueden actuar simultáneamente. La principal diferencia entre ellas radica en que en la teoría de la acumulación de mutaciones los genes con efectos negativos en la edad adulta se irían acumulando de una generación a otra, mientras que en la teoría de la pleiotropía antagónica dichos genes quedarían resguardados dentro del genoma.

La denominación de pleiotropía antagónica resulta ser un término excesivamente científico, por lo que se buscó otro alternativo que explicase más sencillamente por qué un mismo gen puede tener simultáneamente efectos deletéreos y beneficiosos. Por ello se propuso la teoría del "soma predispuesto" o disponible<sup>11</sup> que especula la existencia de un tipo especial de genes con efectos positivos sobre la reproducción, pero con efectos negativos sobre las células somáticas del adulto. Esta misma teoría había recibido previamente el

término del "error catastrófico" por ORGEL<sup>12</sup> que en su forma original se limitaba a considerar el envejecimiento como resultado del fallo de la síntesis proteica producido en las células somáticas. Esta teoría fue ampliamente rebatida, mientras que la teoría del soma predispuesto fue ganando adeptos, debido a los resultados de nuevos experimentos sobre el papel del mantenimiento somático y de la reparación. Más recientemente la teoría de la pleiotropía antagónica ha recibido el nombre de "pay later", o pague más tarde, más en consonancia con el léxico televisivo. Son de destacar ciertas investigaciones que apoyan la teoría del soma predispuesto, entre ellas la teoría de los radicales libres<sup>13</sup>, la teoría mitocondrial<sup>14, 15</sup> y la teoría de la acumulación de desechos<sup>16</sup>, que más que teorías son mecanismos relacionados con la edad.

#### **Mecanismos y causas del envejecimiento:**

Se han propuesto muchos mecanismos para explicar los cambios fenotípicos observados en los organismos envejecidos y existe una total controversia al no existir una demostración definitiva que favorezca alguna de ellas. Esta falta de acuerdo se debe a varios motivos, entre los que hay que destacar los siguientes:

- a) Los cambios debidos a la edad son muy amplios y se manifiestan tanto a nivel molecular como a nivel del organismo entero.
- b) Los factores ambientales son tan variados que afectan y contaminan los resultados de las observaciones experimentales e incluso pueden dar lugar a resultados contradictorios.
- c) Los efectos secundarios son tan complejos que dificultan el análisis por separado de cada uno de los mecanismos primarios.
- d) Los "biomarcadores" observados en individuos añosos, aunque pueden ser medibles, se alteran en los estudios longitudinales de la población.

Por estas y otras razones no existe una teoría única que sea válida para explicar el proceso del envejecimiento y sus mecanismos pueden ser muy diferentes en determinados organismos, tejidos y células.

El planteamiento básico de una teoría sobre el envejecimiento debería comenzar por establecer los fundamentos evolutivos del mismo. Las presiones evolutivas seleccionan, si bien de forma mínima, la continuidad de la vida con el fin de alcanzar la edad reproductiva, la procreación y un periodo en el cual mantener el cuidado de los descendientes hasta que estos

logren una independencia vital. De esta forma se completa el ciclo de la especie. Más adelante el individuo se vería afectado por tres categorías de genes<sup>17</sup>:

- a) genes que regulan el mantenimiento somático y la reparación celular
- b) genes pleiotrópicos negativos que favorecen la supervivencia precoz, pero que pueden tener efectos desfavorables en la vida tardía (pleiotropía antagonista)
- c) Mutaciones perjudiciales de acción tardía, sobre los que se ejerce poca selección evolutiva. (Figura 3).

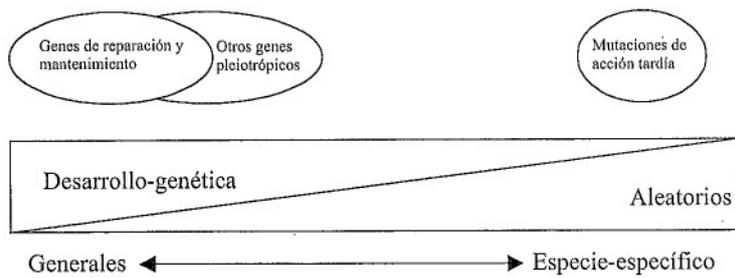


Figura 3.-

Los genes involucrados en el mantenimiento y reparación celulares están presentes en la mayoría, si no en todos los organismos, dado que se trata de procesos similares a todas las especies. Las mutaciones de acción tardía son posiblemente específicas de cada especie y relacionadas con el individuo y con el azar. Por último, los genes pleiotrópicos que no participan en el mantenimiento del individuo, se hallan dentro de una población determinada, aunque no en todas las especies. Desde un punto de vista histórico, los mecanismos que se fueron aportando sobre el envejecimiento dieron lugar a diversas *teorías* que se pueden dividir en dos categorías principales:

### Sugestivas o aleatorias

- Mutación somática y reparación del ADN
- Error-catástrofe
- Modificación de proteínas
- Radicales libres (estrés oxidativo)/ADN mitocondrial

### Genéticas del desarrollo

- Genes de la longevidad
- Síndromes con aceleración del envejecimiento
- Sistema neuro-endocrino
- Sistema inmunológico
- Senectud celular
- Muerte celular

El término genética-desarrollo implica la existencia de un control genético más activo del envejecimiento que el que posiblemente existe en realidad. Por otro lado, las diferentes categorías no se excluyen mutuamente, en especial aquellas que consideran la teoría de los radicales libres-ADN mitocondrial. Probablemente existe un espectro de mecanismos, desde el nacimiento hasta la edad avanzada, que refleja una influencia decreciente de la actividad genética y un aumento de los efectos de las causas ambientales.

### **Teorías sugestivas o aleatorias**

Este grupo de teorías propone que la edad induce la acumulación de lesiones al azar en las moléculas vitales, de forma que los daños sufridos llegan a alcanzar un nivel suficiente para dar lugar a un declinar fisiológico progresivo.

## **La mutación somática y reparación del ADN**

La teoría la mutación somática del envejecimiento establece que el daño genético se produciría por la suma residual de mutaciones que originarían un fallo funcional y posteriormente la muerte del organismo. Esta teoría no ha podido ser comprobada y la experimentación en ratones comprueba que el acortamiento de la vida parece deberse principalmente al aumento de procesos cancerosos y a la glomérulo-esclerosis.

La teoría de la reparación del ADN tiene más consistencia y se basa en la capacidad de reparar el daño producido por la radiación ultravioleta en cultivos celulares de ratones de edad avanzada<sup>18</sup>, si bien los estudios experimentales en otras especies no son concluyentes porque la capacidad de reparación del ADN no cambia de forma drástica con la edad, y porque existen ciertas regiones del ADN que son lugares específicos de reparación que pueden hallarse alterados de forma preferente.

## **El error/catástrofe**

Esta teoría sugiere la producción eventual de errores en las proteínas que sintetizan el ADN y en otras moléculas tomadas como modelo. Por lo general, los errores se producen en proteínas que pierden su natural metabolismo y que son reemplazadas por otras alteradas. De esta forma se alteraría la maquinaria de la síntesis proteica, introduciendo errores en las moléculas de nueva síntesis, produciendo una situación de "error/catástrofe" incompatible con la función normal y consecuentemente con la vida. Las proteínas alteradas se producirían en células de tejidos envejecidos como resultado de modificaciones post-translación, como por ejemplo en los procesos de oxidación y del glucólisis<sup>19</sup>.

## **La modificación proteica**

Además de los cambios que hayan podido sufrir las proteínas en cuanto a su estructura, estos mismos cambios cualitativos conducen a alteraciones en su función. El envejecimiento se acompaña de un descenso específico de la actividad de muchas enzimas, alterando la estabilidad del calor corporal y aumentando el contenido del radical carbonilo de las proteínas. Estas alteraciones pueden ser causadas por la oxidación directa de los residuos de aminoácidos, por la oxidación producida por metales y por la glicogénesis. Se ha especulado con que el acúmulo de proteínas alteradas por defectos en su translación podrían desajustar la función celular y posteriormente la función de un órgano. Un posible ejemplo

viene dado por el colágeno que, si bien con la edad sufre el incremento en su función, podría tener una acción desajustada en otros territorios del organismo<sup>20</sup>.

La reacción no-enzimática de los carbohidratos con los amino grupos de las proteínas (glicación) puede dar lugar a un incremento del proceso y de los productos terminales que aumentarían con la edad y que se encuentran implicados en la diabetes, en ciertas oftalmopatías y en la acumulación de amiloide. Por otro lado, la matriz extracelular juega un importante papel en la regulación de la expresión de ciertos genes y, de ahí, que el entrecruzamiento de ciertas moléculas como el colágeno, la elastina, la osteocalcina y las proteínas del cristalino, responsables estas últimas de cataratas tanto en diabéticos como en individuos afeos, podrían ser la causa de la alteración de ambos procesos. De la misma forma, estas interacciones covalentes proteína/proteína podrían ser responsables de la rigidez de los vasos sanguíneos que se observa en el envejecimiento.

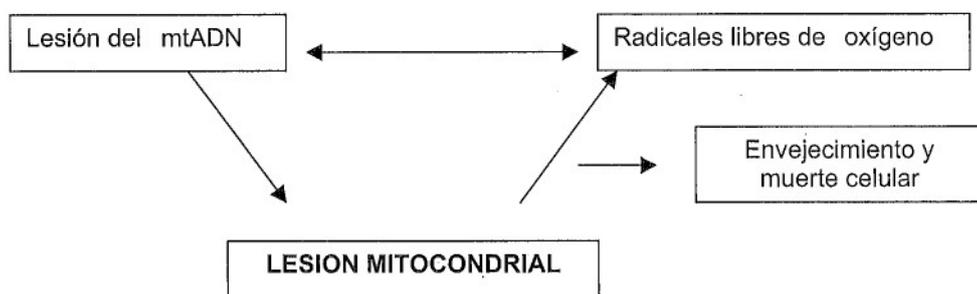
Los estudios epidemiológicos humanos sugieren que un pobre desarrollo precoz se asocia a enfermedades cardiovasculares y degenerativas, lo que se podría explicar tanto por la desnutrición como por aquellas influencias que alteran el crecimiento con cambios en la estructura y fisiología corporales. Estos efectos han podido ser demostrados inicialmente en animales. Un bajo peso al año de edad se asocia con opacidad de las lentes, descenso de los niveles de audición, piel más fina, etc. a lo que se sumarían alteraciones en el sistema reparador celular<sup>21</sup>.

#### **Radicales libres (estrés oxidativo) / ADN mitocondrial**

Otra posible consecuencia de la reacción cruzada de los radicales libres sirve de base para una teoría que participa tanto en la etiología de causas probables o aleatorias, como de las debidas a defectos genéticos del desarrollo. Inicialmente se propuso que los cambios más importantes que se producían en el envejecimiento, eran debidos a daños moleculares producidos por los radicales libres<sup>22</sup> que eran átomos o moléculas que contenían un electrón desaparejado y altamente activos. El metabolismo aeróbico genera el radical superóxido ( $O_2^-$ ) que se metaboliza por las superóxido-dismutasas para formar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno. El peróxido de hidrógeno puede continuar en su metabolismo para formar radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), altamente reactivos. Estos radicales derivados del oxígeno pueden reaccionar con las macromoléculas en forma de auto-perpetuación y originar radicales libres fuera de las moléculas, que a su vez crean nuevos radicales libres en otras moléculas, amplificando la acción inicial de dichos radicales libres. Estas especies de oxígeno reactivo

(ROS) parece que juegan un importante papel regulando la expresión diferencial de los genes, la replicación celular, la diferenciación y la apoptosis, en donde actúan en parte como mensajeros secundarios en las vías de la señal de transducción<sup>23</sup>. La producción de radicales libres en tejido cardíaco, renal y hepático de mamíferos es inversamente proporcional a la vida media máxima de dichos animales, aunque las actividades de las enzimas anti-oxidativas del individuo no están relacionadas con el mencionado parámetro.

La hipótesis del ADN mitocondrial/estrés oxidativo supone la síntesis de diversas teorías y aún aquellas de causas probables con las que se refieren a mecanismos del desarrollo y genéticos del envejecimiento. Se ha propuesto que las especies de oxígeno reactivas contribuyen de forma importante a la acumulación somática de mutaciones del ADN mitocondrial, lo que conduciría a la pérdida gradual de la capacidad bioenergética y eventualmente al envejecimiento y a la muerte.



Se ha demostrado en estudios de poblaciones humanas que el envejecimiento, el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina están fuertemente relacionados. El envejecimiento se asocia a un significativo incremento del estrés oxidativo, debido principalmente a un descenso en la actividad antioxidante y a un aumento de los factores pro-oxidantes, tales como las concentraciones de glucosa y de insulina. Existe simultáneamente una progresiva resistencia a la insulina, que es debida a una compleja red de factores ambientales, antropométricos y neuro-hormonales. La longevidad extrema estaría asociada a un bajo grado de estrés oxidativo y de resistencia a la insulina<sup>24</sup>.

#### **Factores genéticos del envejecimiento y de la longevidad**

El crecimiento tan rápido de la población mundial ha impulsado el estudio de los factores genéticos y ambientales que pudieran contribuir a un envejecimiento saludable y en la actualidad estos estudios son los retos sociales y sanitarios más solicitados de cara al presente siglo. Existe total acuerdo en considerar la longevidad como un rasgo típicamente cuantitativo y su variación vendría dada en las poblaciones naturales por efectos tanto genéticos como ambientales, con una fracción atribuible a la variación genética que se estimaría entre el 10 y el 30% según distintos investigadores. Tal como sucede con los rasgos cuantitativos y antes de llegar a un entendimiento de la genética de la longevidad, existen diversas cuestiones a resolver, más fáciles de plantear que de solucionar:

¿Cuáles son los loci cuyas mutaciones afectan la aparición de la longevidad?

¿Cuáles son los loci que inducen de forma natural la variación de la longevidad entre grupos de una misma población, entre poblaciones y entre especies?

¿Cuáles podrían ser los efectos alélicos de estos loci?

¿Cuáles son los efectos homo y heterocigóticos de los diferentes polimorfismos, las interacciones con otros loci (epistasia) y los efectos sobre otros rasgos (pleiotropía)?

¿Cómo son los efectos moduladores debidos a cambios del ambiente y cuáles las diferencias entre varones y mujeres?

¿Cuáles son las frecuencias alélicas de estos genes en la población natural?

Resulta más fácil hacer preguntas que orientar las respuestas, aunque vamos a intentar resolver algunas de ellas.

Los biólogos evolucionistas, como ya se ha expuesto, han pretendido formular teorías del envejecimiento sobre la base de una compleja actuación genética. Debido a que la intensidad de la selección natural declina con la edad, los alelos con efectos deletéreos en la edad avanzada, pero cuyos efectos son neutros, al menos teóricamente en la época temprana, alcanzarán frecuencias intermedias en las poblaciones. La selección artificial en la *Drosophila* ha servido para documentar la variación genética en las moscas que consiguen la mayor longevidad. Los estudios fisiológicos y genéticos de las variedades de moscas que sufrían dicha selección, mostraban que las líneas de larga vida tenían unas tasas mayores de reproducción tardía, lo que sería otro rasgo a tener en cuenta debido a dicha selección, con reducción de la fecundidad precoz, y que eran resistentes al hambre, a la desecación, al calor y al estrés oxidativo, en comparación con los controles no seleccionados. Estos hallazgos no se

llegaron a observar sistemáticamente en todas las variedades conseguidas a partir de distintas poblaciones, lo que se hallaba en contra de un único mecanismo, sino que eran específicos para un fenotipo determinado.

La complicación nace en los estudios que demuestran que mutaciones de genes concretos pueden tener grandes efectos sobre el incremento de la longevidad en levaduras, en el gusano *Caenorbditis elegans*, en la *Drosophila* y en el ratón, y que los genes implicados participan solamente en unos pocos pasos metabólicos. A partir de ahí, han ido surgiendo hipótesis atractivas que pudiesen configurar una “base unitaria” del envejecimiento celular, entre las que se hallan el acortamiento de los telómeros, la acumulación de mutaciones somáticas en las mitocondrias, el estrés oxidativo y el deterioro celular por radicales libres, los errores en la replicación y reparación del ADN y el mantenimiento de la síntesis proteica. Si bien hay que resaltar que el único factor que conduce a un incremento general de la longevidad animal es la restricción de la dieta, se han analizado otros fenotipos que vienen determinados por loci cuantitativos (QTLs) que de forma natural se relacionan con la variación de la vida media del animal y que se expondrán brevemente

### **Aportaciones de organismos inferiores**

El proceso del envejecimiento puede considerarse como una situación de la vida del individuo que predispone a la aparición de determinadas patologías dependiendo de la edad y que en el caso del hombre podrían quedar reducidas a cardiopatías, artritis, osteoporosis, diabetes, cáncer y enfermedad de Alzheimer<sup>25</sup>. No sería, por tanto, una enfermedad, sino una situación tardía de la vida con determinadas características:

- 1.- Consecuencia inevitable de los organismos multicelulares
- 2.- Disminución de las funciones orgánicas, en dependencia con el azar
- 3.- Pérdida progresiva de la homeostasia
- 4.- Aumento de la mortalidad con la edad

Estas características hacen que para alcanzar una edad longeva, deban concurrir una combinación de factores, como poseer ciertos genes que favorezcan la longevidad, ausencia de variantes genéticas que predispongan a enfermedades y mantener un estilo de vida

consecuente con la salud<sup>26</sup>. A partir de estos factores, el conocimiento de la genética del envejecimiento y de la longevidad puede conducir a la identificación de los genes involucrados en estos procesos y puede en un futuro orientar en el uso de sustancias que retrasen el proceso de la edad, o bien que prevengan las enfermedades asociadas a la misma, aunque es evidente que el hombre, por su vida media elevada y por razones deontológicas no es el modelo adecuado de experimentación del envejecimiento y de la longevidad y ha habido que recurrir necesariamente al estudio de genotipos en otros organismos vivos, como han sido:

- El hongo filamentoso *Podospora auserina*
- La levadura *Saccharomices cerevisae*
- El gusano *Caenorhabditis elegans*
- La mosca de fruta *Drosophila melanogaster*
- El ratón *Mus musculus*
- 

Todos estos organismos son de fácil manejo y mantenimiento y tienen una vida media corta, si bien lo importante es que mantienen una significativa homología con el genoma humano, como se deduce del hecho de que uno de cada cinco genes causantes de patología humana ha podido ser clonado posicionalmente, reflejando un notable grado de conservación genética interespecies.

La metodología utilizada en estos ensayos es muy variada y la mutagénesis es la más empleada, ya que permite modificar la expresión de los genes o la estructura de sus productos, alterando la secuencia del ADN por tratamientos físicos o químicos. Los individuos que presentan fenotipos resultantes apropiados son seleccionados y se aplican varias estrategias con el fin de identificar los loci que puedan estar implicados en la expresión del fenotipo seleccionado. El análisis de los loci de los rasgos cuantitativos (QTLs:) se completa con una serie de técnicas encaminadas a la localización de los genes candidatos en los individuos con fenotipo más marcado, así como por entrecruzamiento selectivo de dichos individuos. De esta forma se va delimitando la relación genotipo/fenotipo y el tipo de transmisión. Estas metodologías han conseguido identificar diversos genes que han sido catalogados dentro de cuatro amplios procesos fisiológicos en relación con la edad:

- 1.- Control metabólico
- 2.- Resistencia al estrés

### 3.- Desregulación génica

### 4.- Estabilidad genética

#### **Nemátodos: *Caenorhabditis elegans***

El primer gen en el que se pudo comprobar su participación en el incremento de la expectativa de vida en este organismo fue el *age-1*<sup>27</sup>, al que siguieron el *daf-2*<sup>28</sup> y el *daf-3*<sup>29</sup>. El paso siguiente consistió en clonar y secuenciar dichos genes e identificar las proteínas que codificaban. El gen *daf-2* codifica una proteína con gran homología a la familia de genes que en los mamíferos incluye el receptor de la insulina<sup>30</sup>. El gen *daf-16* codifica una proteína con homología con un conocido factor de transcripción<sup>31</sup> y el *daf-23*, identificado como el inicial *age-1*, codifica una proteína con homología con el enzima fosfatidil-inositol 3-quinasa<sup>32</sup>. Esta proteína se relaciona con la transducción de la señal del receptor insulina-like, si bien no se ha llegado a aclarar el mecanismo íntimo por el que estos dos genes influyen sobre la longevidad de este gusano.

Los genes *old-1* y *old-2* codifican unos receptores que regulan la actividad de la tirosina-quinasa. La sobreexpresión de cada uno de ellos produce un incremento de la resistencia al calor y a la radiación UV<sup>33</sup>. Ambos genes son idénticos en el 90% de sus nucleótidos y sus mutaciones logran incrementar la expectativa de vida en un 65% y en un 20% respectivamente. Por el contrario, el gen *ctl-1* que regula la actividad de la citosólico-catalasa, reduce la expectativa de vida en un 25%, posiblemente porque incrementa el estrés oxidativo. La mutación de este gen, *ctl-1*, impide el incremento inducido por los genes *daf-2*, *age-1* y *ctl-1*, quizá por motivo aludido.

Los mutantes *clk-1* tienen un crecimiento lento pero un alargamiento de la vida cuando crecen en un medio específico de *E. coli*<sup>34</sup>, ya que no crecen si se retira la coenzima Q de la dieta que no son capaces de sintetizar. Cuando se ajusta este coenzima, la expectativa de vida del gusano se incrementa en un 60% respecto al organismo salvaje. Se han obtenido otros mutantes con defectos alimenticios que tienen una vida media más larga, quizá debido a la restricción calórica, como sucede con el *eat-2* que sobrevive un 50% más que los salvajes. Esta última mutación incrementa la expectativa de vida inducida por las mutaciones *daf-2*, pero no hace lo mismo con las *clk-1*.

En resumen, se puede afirmar que la regulación de la expectativa de vida en el *C. elegans* se halla influenciada al menos por tres vías o procesos distintos: las señales insulina-like, la resistencia al estrés y la tasa del consumo calórico/metabólico.

### Organismo *Caenorhabditis elegans*

Gen	Homólogo humano	Localización en el hombre
daf-2	INSR	19q13.3-13.3
daf-16	FKHRL1	6q21
	FOXO1A	13q14.1
daf-18	PTEN	10q23.31
age-1	PI3 kinase	16p12
tkr-1	Tachykinin receptor	16p21.3
clk	COQ7	16p13.11
pdk	PDPK1	16p13.3
ctl-1	CAT	11p13
akt-1	AKT1	14q32.3
akt-2	AKT2	19q13.1-13.2
	AKT3	1q43-q44

### *Drosophila melanogaster*

Los resultados obtenidos con el *C. elegans* indujeron a varios investigadores a comprobar si en la mosca de la fruta existía una vía de atenuación de la señal insulina-like que incrementase la expectativa de vida en este animal<sup>35</sup> y se pudo comprobar de forma sorprendente que en la mosca los efectos eran sensiblemente mayores en las hembras que en los machos.

Seguidamente los estudios se centraron en el gen SOD1 (Cu/Zn superóxido-dismutasa), comprobando que tenía un importante papel en el proceso del envejecimiento y que ciertos mutantes con deficiencia en el enzima mostraban una reducción de la expectativa de vida en un 20%. Sucesivamente se comprobó que la sobreexpresión de la SOD1 incrementaba la expectativa si se acompañaba de sobreexpresión de la catalasa<sup>36</sup>.

Otro ejemplo de resistencia en la mosca fue comprobado en el gen PCMT, que regula el enzima carboxil-metil-transferasa cuya misión es transformar los residuos isoaspartil en

residuos aspartil, impidiendo su acúmulo en las proteínas que con la edad se producen en individuos con deficiencia o ausencia de PCMT. Cuando existe una sobreexpresión de PCMT las moscas sometidas a temperaturas elevadas, en torno a los 29°, incrementan la expectativa de vida en un 35%<sup>37</sup>. Este enzima ayudaría a mantener la estructura fisiológica de las proteínas y su función durante el envejecimiento mejoraría el estrés de las moscas sometidas a altas temperaturas.

Otros genes identificados han sido el *Methuselah* que codifica una proteína de transducción de la señal transmembrana cuyo papel no está bien aclarado, aunque se sabe que se relaciona con el estrés<sup>38</sup> y el gen que codifica la proteína transportadora del ácido dicarboxil<sup>39</sup>. Esta proteína transportadora se requiere para captar sustancias intermediarias del ciclo del ácido cítrico, como son por ejemplo succinatos, citratos y alfa-cetoglutaratos por las mitocondrias. La mutante Indy (*I'am not dead yet*) se caracteriza por un descenso parcial en la proteína transportadora que incrementa de forma significativa la expectativa de vida. Esta mutación es especialmente importante por su relevancia en el mecanismo básico de la restricción calórica.

Las mutaciones inducidas *mth* e *indy* son mutaciones con pérdida parcial de su función, lo que sugiere que los niveles normales de dichas proteínas no son los más adecuados para la expectativa de vida y su mejor conocimiento podría suponer alguna intervención no genética que fuese favorable para numerosas poblaciones.

En resumen, la regulación de la expectativa de vida en la mosca de la fruta puede verse influenciada por la atenuación de la vía de señal de la insulina-like y por la tasa metabólica, y se asocia a la resistencia al estrés, siendo reflejo de los hallazgos realizados en nemátodos.

### Organismo *Drosophila melanogaster*

Gen	Homólogo humano	Localización en el hombre
Cu/Zn SOD	SOD1	21q22.11
Mn SOD	SOD2	6q25.3
Methuselah		
HSP70	HSPA1A	6p21.3
	HSPA1B	6p21.3
CHICO	IRS1	2q36
	IRS2	13q34
	IRS3L	7q22
	IRS4	Xp21.1-q25
Indy	SLC13A2	17p11.1-q11.1
	SLC13A3	20q12-q13.1
InR	INSR	19q13.3-q13.2

### Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*

En 1991 se descubre el gen *sir-2* que en este organismo codifica la actividad desacetilasa de las histonas y cuya sobreexpresión incrementa la vida media en las levaduras así como en el *C. elegans*<sup>40</sup>. Esta actividad requiere la NAD como cofactor, estableciendo una posible ligazón entre la expectativa de vida y la capacidad nutricional. Las mutaciones en el gen *sch9* que actúa en la vía de señales de la insulina, alarga igualmente la vida media y la resistencia al estrés en las levaduras<sup>41</sup>.

### Organismo *Saccharomyces cerevisiae*

Gen	Homólogo humano	Localización en el hombre
sir-2	SIRT1	10q21.3
	SIRT2	10q13
	SIRT3	11p15.5
	SIRT4	12q
	SIRT5	6p23
	SIRT6	19p13.3
	SIRT7	17q25
lag1	LASS	19p12
sgs	WRN	8p12
ras1	HRAS	11p15.5
ras2	KRAS2	12p12.1
sch9	PKB-Alpha	14q32.3

### Mamíferos: *Mus musculus*

El ratón proporciona el modelo de estudio más adecuado del envejecimiento humano, a la vez que hace de puente entre el hombre y los invertebrados. Los genes más investigados han sido los *Pit1*, *Prop1*, *Ghr* y *Ghrhr*, cuyas mutaciones por pérdida de función producen enanismo y un máximo de longevidad. Todos estos genes se relacionan con la producción de la hormona del crecimiento, o bien tienen la capacidad de responder frente a esta hormona. Los tres primeramente citados muestran una reducción de los niveles de IGF-1, de insulina circulante y de la temperatura corporal. Todos los ratones con mutaciones de uno de los cuatro genes viven más que los controles, con un fenotipo ya observado en moscas y nemátodos. Es de gran interés observar que la restricción calórica aumenta la expectativa de

vida del ratón enano deficiente Prop1, lo que sugiere que un mecanismo doble, por ambas vías, influiría en la tasa de envejecimiento<sup>42</sup>.

Se han estudiado numerosos mutantes en los que observar la mutación de diversos genes y si los enzimas alterados en la prevención o reparación de los componentes celulares dañados, como proteínas, ADN y membranas, juegan un papel crítico en el proceso del envejecimiento. Estos estudios han versado sobre las enzimas de reparación del ADN, sobre enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión-peroxidasa y la metionina-sulfato-reductasa, y se ha comprobado que ciertas sobreexpresiones, como la Sod-1, no refleja en el ratón los mismos efectos que en las moscas. En contraste, el ratón totalmente deficiente para la Sod-2 mitocondrial es extremadamente vulnerable al estrés oxidativo, debido a que las mitocondrias son el lugar primario donde se genera in vivo las especies de oxígeno reactivo (ROS). Este ratón muere en los 30 días siguientes al parto, dependiendo de su fondo genético. Los mutantes con reducción de la actividad de la metionina-sulfato-reductasa muestran una reducción del 40% de su vida media.

El gen p66 codifica tres proteínas que funcionan como sustratos citoplasmáticos de tirosina-quinazas activadas y que están implicadas en la transmisión de las señales de activación de las proteínas Ras. La mutación p66 del gen que codifica la señal de transducción proteica, regula la apoptosis en respuesta al estrés oxidativo e incrementa la expectativa de vida. En el ratón deficiente, la reducción al estrés oxidativo sistémico se acompaña de la reducción de la oxidación de la LDL plasmática, de la oxidación arterial y de las lesiones aterogénicas precoces<sup>43</sup>. Considerado como gen de longevidad, incrementa las especies de oxígeno reactivo y la tasa de las lesiones oxidativas en los ácidos nucleicos. Por otro lado, la función de p66shc sobre ROS es necesaria para que tenga lugar la apoptosis propia p53 dependiente. Dentro de la pared arterial las células producen varios tipos de radicales libres y un importante índice funcional del estado de salud viene dado precisamente por la función vascular. Se han realizado numerosos estudios clínicos en estos animales de experimentación, demostrando que la lipoproteína oxidada de baja densidad (oxLDL) y las vías redox-sensibles son moduladores clave de la disfunción vascular y de la aterogénesis. La ox-LDL y sus subproductos pueden inducir precozmente situaciones desfavorables en las arterias de los animales, tanto adultos como jóvenes. Los ratones homocigotos p66shc<sup>-/-</sup> alimentados con dietas muy ricas en grasas desarrollaban hipercolesterolemia plasmática, pero exhibían una reducción del estrés oxidativo sistémico, de la oxidación de LDL en plasma y de las lesiones ateroscleróticas precoces.

El ratón mutante heterocigoto para el gen p53, con un alelo normal y el otro truncado pero ligeramente activo, es muy resistente al cáncer y, sin embargo, desarrolla unas patologías características y propias de la edad, como son osteoporosis, pérdida de grasa subcutánea, retraso en la cicatrización, atrofia muscular, etc. Otro mutante interesante es el ratón klotho que fallece pronto, pero que muestra igualmente un cuadro sindrómico similar al del envejecimiento humano, con osteoporosis, aterosclerosis, atrofia cutánea, etc.<sup>44</sup>, siendo este gen klotho homólogo al gen que codifica una proteína transmembrana con actividad beta-glucosidasa en el hombre. La asociación con el envejecimiento humano se ha comprobado en individuos con diferentes polimorfismos del gen KLOTTHO<sup>45</sup>. Finalmente, el gen que codifica el tipo de uroquinasa del activador del plasminógeno en el hipotálamo muestra una sobreexpresión en la restricción calórica, ya que regula el apetito, induciendo un menor consumo alimentario y un menor tamaño del cuerpo del animal.

### Organismo *Mus musculus*

Gen	Homólogo humano	Localización en el hombre
p53	TP53	17p13.1
p66shc	p66shc/SHC1	1q21
klotho	KLO	13q12
pit 1	Pit 1	3p11
prop 1	Prop 1	5q
Hormona del crecimiento (pit1 + prop1 deficientes)	GH1	17q22-q24
Receptor de la hormona	GHR	5p13-p12

En conclusión los estudios en gusanos, moscas y ratón hacen pensar que las mutaciones que actúan sobre la hormona del crecimiento reducirían las señales insulina-like con evidente reflejo sobre el envejecimiento. Contrariamente, el estudio en el hombre de la pérdida de función del receptor de la hormona del crecimiento, o síndrome de LARON,

demuestra en los pacientes un fenotipo de talla baja, dismorfia facial, obesidad, descenso de los niveles plasmáticos de glucosa y de IGF-1 y retraso de la pubertad. Estos pacientes no se caracterizan precisamente por la longevidad.

### **Análisis de los fenotipos de envejecimiento prematuro en el hombre**

Las investigaciones en el hombre sobre el envejecimiento se han centrado inicialmente en el análisis de varias enfermedades que cursan con un cuadro de envejecimiento prematuro, intentando encontrar la relación entre los genes mutados y las vías metabólicas alteradas. Los cuadros clínicos más destacados son:

- El síndrome de HUTCHINSON-GILFORD, conocido como progeria precoz infantil y debido a mutaciones del gen LMNA (lamina A) en 1q21.2.
- El síndrome de COCKayne por mutaciones CSA y CSB en el cromosoma 5.
- El síndrome de WERNER por mutaciones del gen RECQL2 en 8p12-p11.2.
- El síndrome ataxia-telangiectasia por mutaciones del gen ATM, localizado en 11q22.3.
- El síndrome de DOWN debido a trisomía del cromosoma 21.

Las homologías entre los genes del ratón y los humanos, implicados en el proceso del envejecimiento y las características de los síndromes citados han sugerido orientar los estudios hacia la teoría neuroendocrina y la teoría inmunológica. La primera de ellas propone que las alteraciones funcionales de las neuronas y de las hormonas derivadas pueden ser el centro del proceso del envejecimiento<sup>46</sup> y que el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal sería el principal regulador del envejecimiento en el organismo. Debido a que el sistema neuroendocrino regula el desarrollo precoz, el crecimiento, la pubertad, el control del sistema reproductor, el metabolismo y otros muchos aspectos de la fisiología normal, los cambios funcionales en dicho sistema se traducirían en todo el organismo. El declinar de la capacidad reproductora femenina es, sin duda, un ejemplo de cambio neuroendocrino relacionado con la edad. Experimentalmente se ha comprobado que la ablación de la hipófisis, seguida de la administración de las hormonas correspondientes, mantiene e incluso incrementa la vida media en ratones. Hay que admitir, sin embargo, que estos cambios pueden producir manifestaciones secundarias del fenotipo del envejecimiento.

La teoría inmunológica se basa en dos observaciones principales. Una, que la capacidad funcional del sistema inmune se aminora con la edad, como se demuestra porque las células T tienen una reducida respuesta a los mitógenos y frente a las enfermedades infecciosas y dos, porque el fenómeno autoinmune aumenta con la edad, con incremento de autoanticuerpos en el suero<sup>47</sup>. Aunque el sistema inmune juega un papel en el mantenimiento de la salud y de la supervivencia, podría tratarse igualmente de un rasgo fenotípico del envejecimiento.

Varios estudios epidemiológicos señalan que un deficiente desarrollo temprano se asocia a enfermedades cardiovasculares y degenerativas que tendría su explicación tanto en la propia desnutrición como en ciertas influencias que alterarían el crecimiento con cambios en la estructura y en la fisiología corporales. Un bajo peso al año de edad se asocia a opacidad de las lentes, descenso de la audición, piel fina, etc., e inclusive alteraciones en el sistema reparador celular<sup>48</sup>. Igualmente se ha comprobado que ciertas enfermedades asociadas con la edad, incluyendo la diabetes no insulino dependiente y la hipertensión, serían más frecuentes en nacidos con bajo peso.

### **Reproducción y envejecimiento: Diferencias orgánicas por el género.**

La mayoría de las discusiones sobre el envejecimiento se han centrado en sus efectos sobre la mortalidad más que sobre la reproducción, aunque su impacto en la reproducción sea socialmente tan importante como en aquella. El envejecimiento reproductivo puede ser explicado como parte del envejecimiento fisiológico, de forma que los mismos efectos lesivos influirían tanto en la supervivencia postreproductiva como en la selección sobre la línea germinal.

Un ejemplo bien distinto de la supervivencia postreproductiva es la menopausia humana, donde la fertilidad de las mujeres sufre una abrupta interrupción en torno a los 45 – 50 años de vida, cuando el impacto sobre el envejecimiento y sobre otras funciones orgánicas es todavía muy pequeño. Si bien la causa inmediata de la menopausia parece ser la depleción de los oocitos, unida a importantes cambios neuroendocrinos, surge la pregunta de por qué la selección natural no ha producido un pequeño reducto de oocitos que perdurasen más tiempo. Una razón sería que durante la mayor parte de la historia evolutiva de la humanidad, las mujeres raramente sobrevivían más allá de dicha edad, de forma que la selección simplemente se habría encargado de producir más oocitos de los necesarios. Por otro lado, las mujeres que suelen tener menores riesgos durante su edad precoz y que alcanzan más fácilmente que los

varones la edad fértil, tienen una posibilidad razonable de sobrevivir más allá de la edad de la menopausia y todo ello indicaría que la menopausia puede tener un significado evolutivo más profundo.

El envejecimiento reproductivo humano supone que, aunque la línea germinal en sentido fundamental es inmortal, ya que sus lesiones no se acumularían sin riesgo de extinción de la especie, se van acumulando lesiones sobre las células germinales con la edad. En el ovario humano las pérdidas foliculares se aceleran a partir de los 35 años y en el varón la fertilidad comienza a declinar en torno a los 45 años de edad. Pese a esto, es de señalar que los hijos sanos de parejas afeadas no se hacen viejos prematuramente, aunque existe la sugestión de que la longevidad en las hijas se ve afectada adversamente por la edad avanzada paterna<sup>49</sup>.

Un mecanismo de importante significado en la evolución de la inmortalidad de la línea germinal de la mujer es el producido por el cuello de botella de la población mitocondrial celular durante la gametogénesis. Un complemento sano de mitocondrias es esencial para la posterior viabilidad de la descendencia y las mutaciones en el ADN mitocondrial tenderían a acumularse con la edad de la mujer. El mecanismo del cuello de botella podría seleccionar, si bien groseramente, las mutaciones del mtADN con beneficio para las mitocondrias intactas.

Otras diferencias fenotípicas entre el varón y la mujer se observan en el distinto comportamiento de la presión sanguínea a lo largo de la vida del individuo. La presión sanguínea elevada es uno de los principales factores de riesgo de complicaciones cardiovasculares y de muerte. Es de notar que la presión pulsátil es más baja durante el proceso menopáusico de la mujer que en el varón de la misma edad y que posteriormente la presión pulsátil se incrementa más rápidamente en la mujer que en el varón, para igualarse en ambos sexos en torno a los 70 años de edad.

La larga vida postmenopáusica de la mujer sería un fenómeno en la escala evolutiva de la humanidad que ha sido recientemente explotado en estudios epidemiológicos en los que se intuyen ligamientos entre la menopausia y la longevidad humanas. En ellos se ha comprobado que las mujeres con pocos hijos y especialmente las que los tuvieron ya afeadas, incluso después de los 50 años, presentaban un incremento de la longevidad<sup>50</sup>. Un potencial mediador en este trasiego serían los estrógenos y la persistencia de su efecto a lo largo de la actividad menstrual, junto con una mayor sensibilidad de las células diana a la acción de dichas hormonas, aunque podrían aumentar el riesgo de cáncer de mama y de endometrio. Estos procesos afectarían globalmente la longevidad por la muerte de un cierto número de mujeres,

pero el efecto persistente del estrógeno se contrapondría ampliamente al descenso del riesgo cardiovascular proporcionado por los estrógenos.

Los datos demográficos sugieren la existencia de distintas trayectorias a lo largo de la vida de las mujeres, como la mencionada anteriormente del papel de los estrógenos, que marcan importantes diferencias en la incidencia y prevalencia de las enfermedades relacionadas con la edad. En un amplio estudio en poblaciones italianas<sup>51</sup> se analizaron 1.162 individuos centenarios, de los que 222 eran naturales de Cerdeña, 43 de la provincia de Mantua y el resto de otras provincias italianas. La relación M/V (mujeres/varones) fue de 2/1 en Cerdeña, de 4/1 en el conjunto italiano y de 7/1 en Mantua, variaciones que suponen la compleja interacción del ambiente y de factores históricos y genéticos. En este mismo estudio se pudo comprobar que los varones centenarios mantenían una mejor salud física y mental que las mujeres.

Estas diferencias entre los sexos parecen radicar en factores postinflamatorios, en ciertos haplotipos del sistema HLA, así como en polimorfismos del gen THO (tirosina-hidroxilasa), de la IL-6 (interleuquina 6) y en haplogrupos del ADN mitocondrial, como puede deducirse de numerosos estudios en diferentes poblaciones. Los resultados del trabajo mencionado sobre poblaciones italianas parecen indicar que los factores de la longevidad en mujeres tienen menos dependencia genética respecto a los varones y que las condiciones ambientales son más favorables en las mujeres, al igual que un estilo de vida más sano.

Un efecto positivo sobre la longevidad en la mujer viene proporcionado por el gen HFE de la hemocromatosis familiar. Este gen es el más telomérico del sistema HLA, localizado en 6p21.3, y codifica una cadena alfa de la clase I de dicho sistema que no participa en la inmunidad porque ha perdido la capacidad de unirse a péptidos. La proteína HFE se expresa en eritrocitos crípticos del duodeno y regula la captación del hierro por las células intestinales, ya que ha adquirido la capacidad de formar un complejo con el receptor de la transferrina. La deficiencia en hierro parece estar asociada a anomalías reversibles de la inmunidad. La mutación C282Y (cisteína por tirosina en el aminoácido 282) del gen HFE ha sido identificada como la mutación más común de la hemocromatosis familiar. Esta mutación ha tenido una amplia difusión por la deriva migratoria de la población celta y proporciona una ventaja selectiva para los portadores heterocigotos, favoreciendo la supervivencia durante la infancia, la adolescencia y el embarazo, ya que permite un incremento en la absorción del hierro y su acumulación en depósitos repercute en la dieta pobre en dicho metal<sup>52</sup>. La mutación C282Y tiene una elevada prevalencia en poblaciones de mujeres del norte de

Europa, una baja prevalencia en el área mediterránea e incluso está ausente en poblaciones del lejano Este.

Se ha sugerido que esta mutación se asienta sobre el haplotipo ancestral 1 del sistema HLA y que tuvo lugar hace miles de generaciones en un ancestro celta del que se ha venido transmitiendo al 5% de individuos de raza blanca, actuales portadores. Otro gen posiblemente implicado es el HSPA1A (*Heat-shock 70 KD protein 1A*), contiguo al HFE en 6p21.3, del que se ha analizado el polimorfismo (A/C) de la región promotora en 263 varones y 328 mujeres de edades entre los 18 y 109 años, que no padecieran manifestaciones clínicas y que tuvieran parámetros hemato-clínicos normales<sup>53</sup>. Paradójicamente se comprobó un descenso de la actividad edad-dependiente en mujeres, lo que supondría un efecto desfavorable para la longevidad. Por tanto, el efecto favorable del gen HFE sería aislado, sin relación con otros genes contiguos y relacionado básicamente con la alimentación pobre en hierro que suele ser característica en ancianos.

### **Polimorfismos genéticos hallados en el envejecimiento**

Se conoce desde muy antiguo la agregación familiar de las enfermedades relacionadas con la edad, tales como las cardiovasculares, la diabetes, el ictus cerebral, las deficiencias oculares y auditivas, etc. En general estos procesos multifactoriales suponen que los pacientes de primer grado tienen un riesgo de padecerlos estimado como 2,6 veces mayor que el de la población general, con mayor incidencia en varones y en formas prematuras que se hayan manifestado en individuos de menos de 56 años<sup>54</sup>. Los factores ambientales de riesgo suponen un exagerado efecto adverso en pacientes con susceptibilidad genética, ya que se solapan entre sí, al igual que lo hacen con ciertos polimorfismos genéticos. El envejecimiento, el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina están fuertemente relacionados debido a su asociación con el incremento del estrés oxidativo, principalmente por descenso de la actividad antioxidante y por aumento de factores pro-oxidantes, tales como las concentraciones de glucosa y de insulina. La progresiva resistencia a la insulina se debe a una compleja red de factores ambientales, antropométricos y neurohormonales. La longevidad extrema se asociaría a un grado bajo de estrés oxidativo y de resistencia a la insulina<sup>55</sup>. Son particularmente importantes los avances en la investigación del metabolismo de los lípidos que han logrado modificar la progresión de las enfermedades vasculares con la administración de diferentes preparados. El esfuerzo en la prevención de estas enfermedades, propias de la vejez, incluye la epidemiología genética, el desarrollo de un *screening* poblacional, la consideración de sus

implicaciones socioeconómicas y la educación de profesionales y público. En el siguiente cuadro, modificado de BARBIERI<sup>55</sup>, se resumen las posibles alteraciones de los genes considerados como mayores o principales, su relación poligénica y los agentes ambientales.

### **Identificación de los genes de la longevidad humana**

Una vez que se han conseguido demostrar los polimorfismos desfavorables que inciden en la aparición de enfermedades dependientes con la edad, que la investigación en animales de experimentación ha proporcionado varias vías de estudio y que se han establecido las posibles causas de las diferencias fenotípicas entre sexos, el paso siguiente es el análisis de los genes cuyos polimorfismos participen en la longevidad humana. Este análisis ha de centrarse en poblaciones humanas de edad avanzada, longevos y centenarios en las que ha sido posible demostrar varias observaciones:

- Que existe un elevado riesgo relativo, de cuatro a siete veces, entre hermanos de centenarios de alcanzar dicha edad. En poblaciones donde el riesgo es de ocho veces el de los controles necesariamente ha de existir un importante componente genético para la longevidad excepcional<sup>56</sup>.
- La proporción de individuos que alcanzan los 100 años de edad está entre 1/5.000 a 1/10.000 individuos, riesgo menos común que el de otros síndromes complejos, tales como la diabetes tipo 2.
- Habitualmente los centenarios mantienen una buena salud hasta edades muy avanzadas y una buena parte de ellos consumen pocos medicamentos hasta la edad de los 70 años, aun cuando con frecuencia presenten hábitos poco saludables, como obesidad y tabaquismo, lo que sugiere una disposición más genética que ambiental para la longevidad.
- Los centenarios tienen periodos más reducidos de morbilidad que los individuos que fallecen a edades más tempranas<sup>57</sup>.

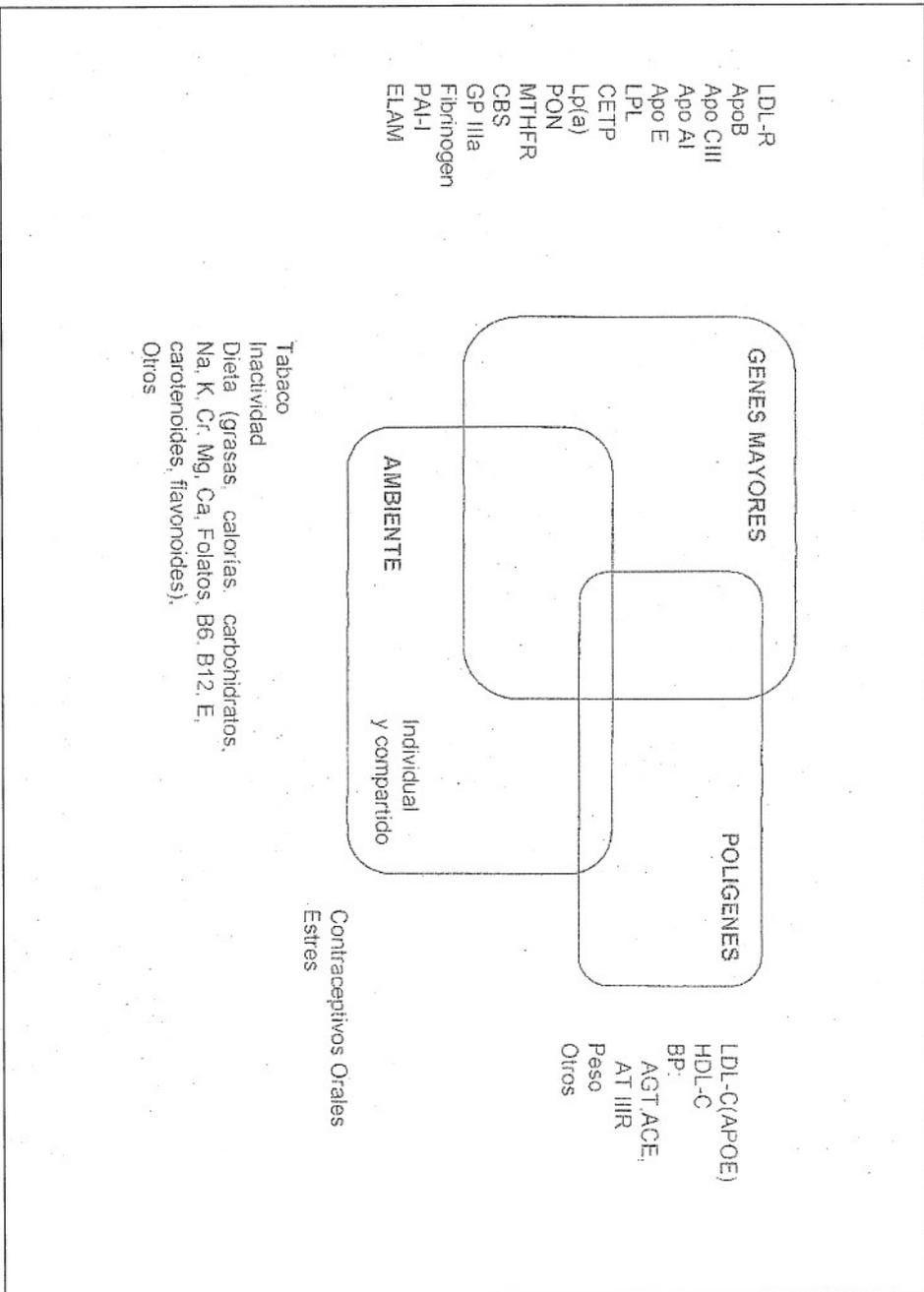


Gráfico 1

El estudio en individuos centenarios de los genes involucrados en la longevidad requiere muestras numerosas que definan la relación genotipo/fenotipo. Las poblaciones homogéneas tienen la ventaja de que sean relativamente pocos los genes candidatos a considerar como responsables de la longevidad, por lo que sería más fácil su identificación. Un punto importante es que en el grupo de centenarios se debe investigar los biomarcadores y los rasgos intermedios que revelen su estado clínico de envejecimiento y de longevidad y que no suelen ser debidamente considerados en algunos casos.

La longevidad se considera como un rasgo complejo que se ve afectado por factores genéticos y ambientales con interrelaciones entre ellos. La primera confirmación de la influencia genética sobre la longevidad se realizó en individuos emparentados y especialmente en gemelos, como se comprobó en una publicación danesa en donde la varianza genética referida a la duración de la vida se estimó del 25%<sup>58</sup>. Quedaba demostrada la importancia que los genes juegan modulando la supervivencia individual y simultáneamente se pudo confirmar que no existían efectos aditivos genéticos en la expectativa de vida debidos a interacciones de genes, tanto de un único locus, como de diferentes loci. Esta ausencia de efectos sumatorios sería un mecanismo importante para mantener la supervivencia individual, aunque queda pendiente hallar una evidencia molecular que lo demuestre<sup>59</sup>.

En un estudio realizado en 308 individuos longevos de 137 familias italianas se ha podido comprobar, empleando un *scanning* genómico completo, un ligamiento de la longevidad con el cromosoma 4, a nivel de la sonda D4S1564 con un *lod score* de 3,65 en probandos de edad superior a 90 años<sup>60</sup>. Queda por investigar la posible asociación con genes candidatos ubicados en dicha región.

#### **Gen ACE.**

Este gen (enzima convertora de la angiotensina-1), es actualmente referido como DCP1 (dipeptidil-carboxipeptidasa).

En las revisiones sobre el papel de ciertos polimorfismos no es de extrañar encontrar estudios contradictorios en las frecuencias comprobados en individuos longevos, en especial cuando las determinaciones se han realizado en poblaciones sometidas a un elevado número de migraciones. Tal es el caso de los polimorfismos del gen ACE (enzima convertora de la angiotensina-1) en la población danesa<sup>61</sup>. En dicho estudio se recogieron 10.150 individuos en los que no se pudieron identificar los polimorfismos del gen ACE como marcadores para la

enfermedad isquémica cardíaca o el infarto de miocardio tanto en mujeres como en varones. Las frecuencias del genotipo D/D y del alelo D no se afectaban estadísticamente con la edad, ni con el género, lo que indicaba que el gen o su polimorfismo podría no influir en la longevidad.

Un estudio más reciente parece confirmar que el alelo D y el genotipo D/D son más frecuentes en los centenarios que en los controles de 20 a 70 años, así como que no existen diferencias entre los sexos<sup>62</sup>. En individuos centenarios el polimorfismo I/D se relaciona con la actividad de la ACE circulante, de forma que el genotipo D/D se asocia a mayores concentraciones séricas (89 +/- 36,8 U/L, el genotipo I/I con concentraciones más bajas (55,1 +/- 39,4 U/L) y el genotipo heterocigoto I/D con valores intermedios (65,5 +/- 34,1 U/L). En los individuos longevos no existía una relación significativa entre el alelo D y el genotipo D/D, mientras que existía un incremento de la actividad del enzima desde la infancia hasta la pubertad donde se observaba el rango máximo. Los resultados del anterior estudio parecen limitar el interés en considerar el alelo D como un posible marcador genético, o bien la concentración de ACE como marcador fenotípico de la longevidad. Parece, pues, que el aumento de la actividad de ACE puede ser tanto beneficioso como perjudicial y que el posible equilibrio podría sufrir cambios durante la vida del individuo. El alelo D parece proteger contra el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y su incidencia se incrementaría en individuos de mayor edad<sup>63</sup>.

#### **Gen APOE.**

Presenta tres alelos principales que difieren en varias propiedades funcionales. El alelo APOE\*3 es el más frecuente, en particular en poblaciones dedicadas a la agricultura, como por ejemplo el área mediterránea, con una frecuencia entre 0,849 y 0,898. El alelo APOE\*2 fluctúa entre 0,145 y 0,02 y el APOE\*4 está más extendido en poblaciones africanas y asiáticas<sup>64</sup>. Un estudio en 177 centenarios daneses demostró que la frecuencia del alelo épsilon-4, asociado a aterosclerosis prematura y a la enfermedad de Alzheimer, en centenarios era de 0,15 frente a un 0,29 de los controles y que la frecuencia del alelo épsilon-2, asociado a los tipos III y IV de hiperlipidemia, era de 0,21, frente al 0,13 de los controles<sup>65</sup> por lo que ciertos investigadores hacen hincapié en que el gen APOE tiene una acción débil en la selección de poblaciones longevas, y que el incremento del alelo épsilon-2 podría influir débilmente en beneficio de los varones.

### **Genes APOA1, APOC3 y APOA4.**

Estos genes localizados en tandem en la región 11q23-24, han sido ampliamente analizados en pacientes con alteración de las lipoproteínas y con patología cardiovascular. Un estudio en 800 individuos de edades entre los 18 a los 109 años comprobó una variación significativa del gen APOA1 con descenso del alelo A en el grupo entre 46 a 80 años y un aumento inesperado del alelo P que se sobreexpresaba en el grupo de varones de mayor edad<sup>66</sup>. No se observaron diferencias alélicas de los genes APOC3 y APOA4.

### **Gen PI.**

Este gen, inhibidor de las proteasas y localizado en 14q32.1, es considerado como un guardián del tejido vascular y se han analizado los genotipos en 3.300 individuos de edades entre los 20 y 93 años, ya que era conocido que los sujetos con genotipo M/M y M/S presentaban unas cifras de tensión sistólica mayores que la observada en sujetos Z/Z, diferencia que a priori podría suponer un factor de selección positiva en la población<sup>67</sup>. Otra circunstancia interesante se debía a que numerosas mutaciones del gen daban lugar a deficiencias de la alfa-1-antitripsina y originaban un prototipo de enfermedades asociadas a anomalías de varias serpinas<sup>68</sup>. La consecuencia era el depósito de proteínas en los tejidos del sistema nervioso central que daban lugar a graves síndromes neurodegenerativos, como la variante de la enfermedad de ALZHEIMER con corpúsculos de LEVY, la enfermedad de CREUTZFELDT-JACOBS por la proteína prion, la demencia fronto-temporal de PICK por inclusiones de la proteína tau y las inclusiones de hungintina en la enfermedad de HUNTINGTON. Los estudios en longevos, sin embargo, no aportaron datos sobre la prevalencia de algún alelo del sistema PI.

### **Genes REN, THO, PARP y SOD2.**

Por la cercanía geográfica son especialmente interesantes los trabajos sobre polimorfismos de estos genes realizados en poblaciones longevas del norte y sur de Italia, todas ellas con tres o más generaciones, por cuanto que las poblaciones del sur habían sufrido constantes cambios migratorios, en comparación con las del norte de dicho país<sup>69</sup>. Únicamente el gen THO, codificante de la tirosina-hidroxilasa, mostraba una segregación discordante. Este enzima se halla involucrado en la síntesis de las catecolaminas y tiene una acción hormonal en relación con la adrenalina y los neurotransmisores. El polimorfismo (AAGT)<sub>n</sub> se localiza en el intrón 1 con 8 alelos de 10 repeticiones que afectan los niveles de

transcripción de la insulina en el páncreas y en el timo. El análisis genotipo/sexo/área geográfica, dentro de las muestras seleccionadas por longevidad y por controles, demostraron una pérdida del genotipo L/L (alelos largos) en longevos, indicando que dichos alelos serían desfavorables únicamente o preferentemente en varones.

#### **Gen PON1.**

Codificante de la paroxonasa sérica, este gen tiene un papel importante en la peroxidación de las LDL y en la capacitación de las proteínas asociadas a la lipoproteína para modular la respuesta inflamatoria local. La enzima codificada es una arilesterasa de unión a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que hidroliza los lipoperóxidos y que es responsable de los efectos protectores de las HDL sobre la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por otro lado, las LDL oxidadas son capaces de estimular la producción de células espumosas que son citotóxicas para las células de las paredes arteriales y que inducen el acúmulo de citoquinas en los macrófagos, resultando ser altamente pro-inflamatorias y pro-aterogénicas. Los alelos estudiados en centenarios han sido el codón 192 (Gln/Arg = alelos A/B) y el codón 55 (Leu/Met = alelos L/M). La frecuencia del alelo B se incrementaba desde los jóvenes a los centenarios e indicaría que podría hacer descender la mortalidad en los portadores<sup>70</sup>. Los estudios realizados en poblaciones del área mediterránea no apoyaban una asociación significativa entre el polimorfismo PON1-192 A/B y enfermedades cardiovasculares, incluso parece ser que los portadores del alelo B se hallan más protegidos cuando existen otros factores de riesgo conocidos, como el tabaco, la hipercolesterolemia familiar o los niveles bajos de HDL-colesterol.

#### **Gen IL-10.**

Localizado en 1q31-32, este gen codifica la interleuquina 10 y es capaz de bloquear la producción de aterosclerosis tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>71</sup>. Una baja expresión de IL-10 podría favorecer los mecanismos de inflamación, de la respuesta inmune y la pro-fibrosis de los tejidos lesionados. El genotipo homocigoto -1082 G->A, (G/G), se halla aumentado en varones centenarios, lo que parece indicar que el varón y la mujer siguen estrategias diferentes para alcanzar la longevidad.

## Gen IGF-1.

Las observaciones demostradas en animales de experimentación, como ya se expuso, sugirieron que las vías de respuesta del factor de crecimiento *insulin-like* (IGF-1) afectan la vida media del animal. En base a estas experiencias se han estudiado las variantes polimórficas de los genes involucrados en dichas vías: el polimorfismo G/A en el codón 1013 del gen IGF-IR; la variante T/C, -359bp del gen PI3KCB (fosfoinositol-3-quinasa); la variante G/A del codón 972 del gen IRS-1 (sustrato 1 del receptor de la insulina) y la variante T/C, +9734bp del gen FOXO1A, involucrado en la diabetes tipo 2. Las combinaciones de los genotipos IGF-IR y de PI3KCB afectaban los niveles plasmáticos de IGF-1 libre, a la vez que la longevidad<sup>72</sup>. Estos estudios han supuesto la primera indicación de que los niveles plasmáticos de IGF-1 libre y la longevidad humana están coregulados por un grupo de genes superpuestos que contribuyen a la hipótesis del impacto de las vías de IGF-1/insulina sobre la longevidad, como una propiedad que se ha conservado en la evolución del reino animal.

## Polimorfismos del ADN mitocondrial.

En papel del mtADN en la herencia materna de la longevidad ha sido considerado desde hace varios años<sup>73</sup>. Es claro que para alcanzar una longevidad con buena salud se precisa la interacción de una variedad de genes, de condiciones ambientales favorables y de determinados estilos de vida. Debido a la importancia crítica de la producción de energía, las mitocondrias y sus secuencias genéticas han sido ampliamente analizadas con el fin de poder desvelar los posibles cambios asociados a la edad y a las enfermedades relacionadas con ella. La elevada tasa de mutaciones del mtADN se debe en parte a la falta de un mecanismo efectivo de reparación de su molécula y en parte a su exposición continuada a los radicales libres de oxígeno.

Se ha comprobado que las mutaciones y deleciones del mtADN acumuladas con la edad se producen en diversos tejidos, tales como cerebro y músculo, y que estas alteraciones eventualmente desajustan la fosforilización oxidativa (OXPHOS), con lo que la energía llega a descender a niveles incompatibles con las funciones celulares normales. Un modelo propuesto se centra en las interacciones posibles de los genomas nuclear y mitocondrial<sup>74</sup>, presuponiendo una interacción epistática, pero sin efectos aditivos importantes. De la misma forma se admite como principio básico que el sistema OXPHOS declina con la edad porque se

asocia con una acumulación de reordenamientos del mtADN producidos por mutaciones con sustitución de bases. Este concepto indicaría que el mtADN es en realidad un reloj del envejecimiento, ya que dichos reordenamientos se acumulan exponencialmente a partir de los 45 años de edad. Nuevamente han aparecido estudios que demuestran ciertas excepciones. Así por ejemplo, el genotipo mt5178A se halla asociado a la longevidad de los centenarios japoneses<sup>75</sup> y se caracteriza porque suprime la aparición de mutaciones en el mtADN de los oocitos y porque retrasa la acumulación de mutaciones debidas a la edad en las células somáticas. Otros efectos beneficiosos de este genotipo es que confiere resistencia frente a las enfermedades relacionadas con la edad, suprimiendo la predisposición a la obesidad y a la aterosclerosis. Estos polimorfismos pueden, sin duda, producir ligeras diferencias en las proteínas codificadas y en la producción de radicales libres, por lo que no pueden ser considerados como factores neutros.

Los polimorfismos comunes del mtADN determinan unos haplotipos, identificados por RFLPs (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), y más recientemente por secuenciación, cuyas frecuencias varían en las distintas etnias, de forma que la población europea tiene exclusivamente nueve de ellos, designados H, I, J, K, T, U, V, W y X, mientras que la población asiática presenta los A, B, C, D y E, y la africana los L1, L2 y L3<sup>76</sup>. Se ha demostrado una asociación entre alguno de estos haplotipos y la longevidad. El haplotipo J tiene una frecuencia significativamente más alta en centenarios del norte de Italia, mientras que en poblaciones longevas de Francia e Irlanda predomina el polimorfismo 9055G->A y en las japonesas el 3010G->A y el 8414C->T. El siguiente paso ha consistido en analizar la variación por edades de las frecuencias de los distintos haplotipos y a la vez contrastarlos con los fenotipos de la población de longevos<sup>77</sup> de diferentes poblaciones del Norte de Europa.

## Frecuencia de haplotipos de sujetos >90 años, de controles y niños

Haplogrupo	>90 años	Controles	Niños
H	37,3%	51,0%	54,5%
I	3,6%	2,5%	2,3%
J	8,4%	6,3%	3,1%
K	7,6%	6,0%	4,7%
M	0,4%	1,0%	1,9%
T	4,9%	5,5%	2,3%
U	28,4%	20,5%	23,0%
Otros	1,8%	0,3%	0,4%

Los datos presentados demuestran que la frecuencia del haplotipo J aumenta con la edad de la población en varios estudios europeos, siendo todavía mayor la frecuencia del subgrupo J2 en individuos de más de 90 años. Resulta igualmente interesante haber comprobado que el haplotipo J modula la expresión fenotípica de las mutaciones 11778G->A y 14484T->C del mtADN que originan la neuropatía óptica de LEBER (LHON)<sup>78</sup> y que la frecuencia del subgrupo J1 es ocho veces superior en pacientes con LHON con respecto a los controles, de forma que este subgrupo sí que incrementaría el riesgo deletéreo de una mutación del mtADN.

Se han venido realizando profusos estudios en poblaciones muy seleccionadas que han conseguido delimitar en ellas las diferencias en los haplotipos de mtADN. Estas variaciones no han podido ser explicadas en base a los movimientos migratorios que a lo largo de siglos hayan sufrido las distintas poblaciones, por lo que su análisis se ha centrado preferentemente en posibles factores ambientales que pudiesen condicionar el incremento específico de cada haplogrupo. Esta selección ha permitido simultáneamente reconsiderar las variaciones en cualquiera de los 13 genes codificantes de los polipéptidos del sistema OXPHOS, todos ellos implicados de una forma u otra en la producción de energía y en el aporte calórico para mantener la temperatura corporal e integrantes de los siguientes complejos:

- ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6 del complejo I

- NADH- deshidrogenasa y citocromo b del complejo III
- COLI, COLII y COLIII del complejo IV (citocromo- c- oxidasa I)
- ATP6 y APT8 del complejo V (ATP-oxidasa)

Las variaciones comprobadas por secuenciación de los 13 genes mencionados no muestran desviación respecto del modelo neutro estándar en poblaciones africanas, mientras que sí lo hacen en poblaciones de Europa, Asia, Siberia y en nativos de América. Aun cuando el gen ATP6 es uno de los que codifica las proteínas más conservadas, se observó una gran variación entre individuos de zonas tropicales, templadas y árticas, seguido de variaciones del citocromo b (complejo III) en zonas templadas y de la citocromo-oxidasa I en el trópico<sup>79</sup>. Las variantes de estos tres genes parecen tener un significado funcional, donde la selección jugaría un papel importante en la variación geográfica, siendo el clima una posible influencia selectiva. De igual forma cabría admitir que las mismas variantes ventajosas en ambientes climáticos específicos y en condiciones dietéticas determinadas, podrían resultar insanas cuando los individuos portadores se desplazasen a ambientes distintos. En este supuesto, las variantes mtADN regionalmente beneficiosas para una grupo de individuos, podrían ser motivo de alteraciones bioenergéticas, tales como obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, etc. en el mismo grupo residente en otras áreas geográficas.

Las fuertes transiciones en los tipos del mtADN entre las poblaciones de Africa y Euroasia y entre Asia del Sur y Siberia se relacionan con la latitud geográfica de dichas regiones e indican que la diversificación del mtADN ha estado sometida a una selección climática. Las mitocondrias quemar calorías para producir ATP, pero también generan calor para mantener la temperatura corporal. El equilibrio entre ambos procesos viene determinado por la eficacia del OXPHOS que en gran medida está regulada por la proteína del gen mitocondrial ATP6. Un OXPHOS eficiente produce en primer lugar ATP con un gasto menor para el calor corporal. Un OXPHOS menos eficiente genera más calor para una misma cantidad de ATP<sup>80</sup>. En los trópicos sería ventajoso un OXPHOS muy eficiente, mientras que uno menos eficiente podría ser imprescindible para la supervivencia en poblaciones del Artico. Esta circunstancia se comprueba ya que la secuencia de aminoácidos de la proteína ATP6 es hipervariable en poblaciones árticas, lo que sugiere que este gen mtADN ha sido un factor importante para la adaptación del hombre en países extremadamente fríos. Por otro

lado, una reducción en la eficacia del sistema OXPHOS quemaría más calorías y como resultado menores equivalentes reductores de la dieta inducirían la producción de ROS. La reducción de ROS a lo largo de la vida del individuo supondría un descenso de la apoptosis y paralelamente el incremento de la longevidad. En otras palabras, un polimorfismo ligado al haplogrupo J y la variante C150T alterarían la eficacia del sistema OXPHOS y la producción de ROS, de forma que se reduciría el estrés oxidativo y se incrementaría la longevidad.

### **Implicaciones genes nucleares y mitocondrias**

Existe general acuerdo en que son principalmente tres las modificaciones ambientales que inducen el incremento de la expectativa en los animales: El descenso de la temperatura ambiental, la reducción de la actividad y la restricción en la dieta sin malnutrición. Por ello, se está profundizando con múltiples trabajos que proporcionen una base científica que explique los mecanismos fisiológicos comunes a dichas circunstancias.

Numerosos de dichos estudios se vienen centrando sobre la regulación de la temperatura corporal que es esencial en los organismos endotermos para que el metabolismo se desarrolle adecuadamente, y para que mediante la puesta en marcha de la termogénesis se consigan los cambios en la temperatura interna y externa del individuo. El proceso de termorregulación aparece, tanto en la exposición al frío como al calor, así como también en ciertas situaciones que incluyen el tipo de alimentación, el proceso de la digestión, el ejercicio físico, el hipo e hipertiroidismo, el consumo de alcohol, las infecciones, etc. La termogénesis es una característica de las células de los animales endotermos que explica la necesidad de que la temperatura corporal se centre próxima a los 37° centígrados, aun cuando exista una baja temperatura exterior.

En ratones expuestos a bajas temperaturas, lo que supone una limitación drástica de la expectativa vital del animal, se ha demostrado que la termogénesis radica en el tejido adiposo marrón (ADM) y en las proteínas mitocondriales desparejadas, las UCPs (*uncoupling proteins*) cuya contribución a la patogenia de la obesidad está siendo estudiada en la actualidad. El descubrimiento del ADM se realizó hace cientos de años, pero ha sido hace poco cuando ha pasado a ser considerado como un órgano endocrino que influye en la presión sanguínea y que es un reservorio de ciertos nutrientes y un regulador termogénico importante<sup>81</sup>.

En los mamíferos el frío continuado genera calor, aunque dificulta el normal movimiento muscular, a diferencia de cuando el ambiente no es frío, la termogénesis facilita el empleo de la musculatura. La termogénesis en mamíferos viene controlada por el ADM localizado próximo a los grandes vasos sanguíneos. Esta localización preferente se comprueba en recién nacidos, pero progresivamente se va trasladando a otros puntos del organismo. La activación del AMP está regida por el sistema nervioso central y por las fibras ortosimpáticas que inervan cada una de sus células. En etapas más tardías del crecimiento, la activación de la termogénesis en el ADM viene regulada por el AMP cíclico, por la hipófisis y por la oxidación de los ácidos grasos en múltiples mitocondrias. Para explicar el comportamiento de los adipocitos marrones se ha pensado en la existencia, dentro de la membrana mitocondrial interna, de una vía de protones regulable. La proteína responsable de la fuga de protones en la membrana interna mitocondrial y del desajuste respiratorio ha sido identificada como UCP1<sup>82</sup>. Esta proteína y la UCP2 se derivan de un ancestro común al igual que otros transportadores mitocondriales. La proteína UCP3 está codificada por un gen localizado en 11p, muy próximo al de la UCP2, donde igualmente están localizados los genes de la insulina y del HRAS, relacionados con el proceso del envejecimiento. Los estudios de segregación entre dichos genes muestran un fuerte ligamiento<sup>83</sup>, con  $p < 0,00002$ , por lo que se está procediendo al estudio de determinadas poblaciones humanas, con el fin de demostrar su posible influencia.

La participación de los genes UCPs en la dieta y en el proceso del envejecimiento ha sido estudiada en ratas donde se ha demostrado que la expresión del gen UCP2 en el tejido adiposo marrón se hallaba elevada en animales alimentados con proteínas vegetales, frente a otros tipos de nutrición y que la expresión de los ARN mensajeros de los genes UCP1, 2 y 3 se encontraban especialmente reducidos en los animales más viejos<sup>84</sup>. Esta observación pone de manifiesto la importancia de un determinado tipo de alimentación y su posible influencia sobre la actividad de determinados genes. Por otro lado, en el hombre se ha descrito un polimorfismo del gen UCP2, el -866A/G, que contribuye a la sensibilidad frente a la insulina, incrementando su actividad transcripcional, de forma que en portadores del genotipo -866A/A se asocia a diabetes tipo 2, casi exclusivamente en mujeres<sup>85</sup>, demostrando el interés que se viene dando a estas nuevas vías de experimentación. Estas observaciones indican claramente que las interacciones genes y ambiente en el proceso del envejecimiento y en el incremento de la expectativa de la vida humana están todavía en sus inicios, que es mucho lo conocido, pero que falta mucho más por investigar.

En resumen, las conclusiones que se pueden deducir de la anterior exposición son:

- 1.- Que la teoría de la pleiotropía antagónica, el *pay later*, resulta ser la más adecuada para explicar el proceso del envejecimiento y la longevidad.
- 2.- Que son cada vez mejor conocidos los procesos celulares y moleculares que acompañan al desarrollo del envejecimiento.
- 3.- Que la longevidad humana tiene un límite en la actualidad establecido en torno a los 120 años, insuperable todavía a pesar de las mejoras terapéuticas y preventivas proporcionadas por la moderna Geriatria.
- 4.- Que existen variantes en ciertos genes nucleares que facilitan la expectativa de vida, pero que este comportamiento es más acusado en los animales de experimentación que en el hombre.
- 5.- Que la longevidad depende de rasgos multifactoriales en los que el efecto fenotípico de un determinado gen depende del fondo fisiológico y del habitat sobre los que ha de expresarse.
- 6.- Que el efecto/género hace que las mujeres sean más longevas que los varones, de forma que los varones necesitarían, más que las mujeres, los efectos protectores de ciertos polimorfismos, en especial de los mitocondriales.
- 7.- Que los varones longevos suelen mostrar una mejor salud física y mental.
- 8.- Que los estudios en poblaciones restringidas longevas son imprescindibles para determinar la relación genotipo/fenotipo/ambiente, así como las diferencias con poblaciones limítrofes.
- 9.- Que en el hombre los polimorfismos del ADN mitocondrial constituyen la principal base genética de la longevidad, estableciendo efectos beneficiosos en las poblaciones en función principalmente del clima.
- 10.- Que los estudios de la Gerontología proporcionarán una notable mejoría en la salud y en el bienestar de la población envejecida, implicando a la Sociedad en la resolución de la problemática que se avecina.

## BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- WEISS KM (1998). In search of human variation. *Genomic Res* 8: 691 – 697.
- 2.- HAYFLICK I (2000). The future of ageing: *Nature* 408: 267 – 269.
- 3.- LJUNQUIST B, BERG S, LANKE J, McLEARN GE, PEDERSEN NL (1998). The effect of genetic factors for longevity: a comparison of identical and fraternal twins in the Swedish. *J Gerontol* 53: 441 – 446.
- 4.- ATZON G, SCHECHTER C, GREINER W (2004). Clinical phenotype in families with longevity. *J Am Geriatr Soc* 52: 274 – 277.
- 5.- JAZWINSKI SM (1996). Longevity, genes and aging. *Science* 273: 54 – 59.
- 6.- TROEN BR (2003). The biology of aging. *The Mount Sinai J of Med* 70: 1 – 22.
- 7.- CUTLER RG (1990). Evolutionary perspective of human longevity. En: *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*. McGraw-Hill Publ, New York.
- 8.- ROUSH W (1996). Live long and prosper? *Science* 273: 42 – 46.
- 9.- GRAVILOV LA, GRAVILOVA NS (2002). Evolutionary theories of aging and longevity. *The Sci World Journal* 2: 339 – 356.
- 10.- STEARNS SC, ACKERMANN M, DOEBELI M, KAISER M (2000). Experimental evolution of aging, growth and reproduction in fruitflies. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3309 – 3313.
- 11.- KIRKWOOD TBL, AUSTAD SN (2000) Why do we age? *Nature* 408: 233 – 238.
- 12.- ORGEL LE (1970). The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevant to aging: a correction. *Proc Natl Acad Sci USA* 67: 1476.
- 13.- BECKMAN KB, AMES BN (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78: 547 – 581.
- 14.- VIJG J (2000). Somatic mutations of aging: a re-evaluation. *Mutat Res* 447: 117 – 135.
- 15.- GERSHON D (1999). The mitochondrial theory of aging: is the culprit a faulty disposal system rather indigenous mitochondrial alterations? *Exp Gerontol* 34: 613 – 619.
- 16.- TERMAN A (2001). Garbage catastrophic theory of aging; imperfect removal of oxidative damage? *Redox Rep* 6: 15 -26.
- 17.- KIRKWOOD TB (1996). The human senescence. *Bioessays* 18: 1009 – 1016-
- 18.- HANAWALT PC, GEE P, HO L (1992) Genomic heterogeneity of DNA repair. Role in aging? *Proc Natl Acad Sci Am N Y* 663: 17 – 25.
- 19.- KRISTAL BS, YU BP (1992). An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions, *J Gerontol* 47: B107 – B114.
- 20.- REISER KM, HENNESSY SM, LAST JA (1987). Analysis of age-associated changes in collagen crosslinking in the skin and lung in monkeys and rats. *Biochim Biophys Acta* 926: 339 – 348.

- 21.- SAYER AA, COOPER C, EVANS JR, RAUF A, WORMALD RP, OSMUND C, BARKER DJ (1998). Are rates of ageing determined in utero? *Age Ageing* 27: 579-583.
- 22.- HARMAN D (1981). The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7124 – 7128.
- 23.- SEN CK, PACKER L (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB* 10: 709 – 720.
- 24.- BARBIERI M, RIZZO MR, MANZELLA D, GRELLA R, RAGNO E, CARBONELLA M, ABBATECOLA AM, PAOLISSO G (2003). Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians. *Exp Gerontol* 38: 137 – 143.
- 25.- JAZWINSKI SM (2000). Aging and longevity genes. *Acta Biochim* 47: 269 – 279.
- 26.- PERLS T, KUNKEL L, PUCA A (2002). The genetics of aging. *Curr Opin Genet Dev* 12: 362 – 369.
- 27.- KLASS M, HIRSH DI (1976). Non-aging developmental variant of *C. elegans*. *Nature* 260: 523 – 525.
- 28.- KENYON C, CHANG J, GENESCH E (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461 – 464.
- 29.- LARSEN PL, ALBERT PS, RIDDLE DL (1995). Genes that regulate both development and longevity in *C. elegans*. *Genetics* 139: 1567 – 1583.
- 30.- KIMURA KD, TISSENBAUM HA, LIU Y, RUVKUN G (1997) *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *C. elegans*. *Science* 277: 942 – 946.
- 31.- OGG S, PARADIS S, GOTTLIEB S (1997). The fork head transcription factor *daf-16* transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389: 994 – 999.
- 32.- MORRIS JZ, TISSENBAUM HA, LIU Y, RUVKUN G (1996). A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *C. elegans*. *Nature* 382: 536 – 539.
- 33.- MURAKAMI S, JOHNSON TE (1998). Life extension and stress resistance in *C. elegans* by the *tkr-1* gene. *Curr Biol* 8: 1091 – 1094.
- 34.- LAKOWSKI B, HEKIMI S (1996). Determination of life-span in *C. elegans* by four clock genes. *Science* 272: 1010 – 1013.
- 35.- TATAR M, KOPELMAN A, EPSTEIN D ET AL (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog extends lifespan and impairs neuroendocrine function. *Science* 292: 103 – 110.
- 36.- ORR WC, MOCKETT RJ, BENES JJ, SOHAL RS. (2003). Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*. 278(29):26418-26422.
- 37.- CHAVOUS DA, JACKSON TR, O'CONNOR CM (2001). Extension of the *Drosophila* lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14814 – 14818.
- 38.- LIN Y-J, SEROUDE L, BENZER S (1998). Extended lifespan and stress resistance in the *Drosophila* mutant Methuselah. *Science* 282: 943 – 946.

- 39.- ROGINA B, REENAN RA, NILSEN SP, HELFAND SL (2000). Extended lifespan conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*. *Science* 290: 147 – 150.
- 40.- TISSENBAUM HA, GUARENTE L (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *C. elegans*. *Nature* 410: 227 – 230.
- 41.- FABRIZIO P, POZZA F, FLETCHER SD, GENDRON CM, LONGO VD (2001). Regulation of longevity and stress resistance by sch9 in yeast. *Science* 292: 288 – 290.
- 42.- BARTKE A, WRIGHT JC, MATTISON JA, INGRAM DK, MILLER RA, ROTH GS (2001) Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* 414: 412.
- 43.- NAPOLI C, MARTIN-PADURA I, DE NIGRIS F, GIORGIO M, MANSUETO G, SOMMA P, CONDORELLI M, SICA G, DE ROSA G, PELICCI PG (2003). Deletion of the p66 (shc) longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2112 – 2116.
- 44.- KURO-O M, MATSUMURA MY, AIZAWA H (1997) Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling aging. *Nature* 390: 45 – 51.
- 45.- ARKING DE, KREBSOVA A, MACEK M, ARKING A, MIAN S, FRIED L, HAMOSH A, DEY S, McINTOSH I, DIETZ HC (2002). Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc. Natl Acad Sci USA* 99: 856 – 861.
- 46.- MOBBS CV (2004). Not wisely but to well aging as a cost of neuroendocrine activity. *Sci Aging Knowl Environ* 35: pe33.
- 47.- CARUSO C, AQUINO A, CANDORE G, SCOLA L, COLONNA-ROMANO G, LIO D (2004). Looking for immunological risk genotypes. *Ann N Y Acad Sci* 1019: 141 – 146.
- 48.- SAYER AA, COOPER C, EVANS JR, RAUF A, WORMALD RP, OSMUND C, BARKER DJ (1998). Are rates of ageing determined in utero? *Age ageing* 27: 579 – 583.
- 49.- GAVILOV LA, GAVILOVA NS (1997). Parental age at conception and offspring longevity. *Clin Gerontol* 7: 5 – 12.
- 50.- WESTENDORP RG, KIRKWOOD TB (1998). Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature* 396: 743 – 746.
- 51.- FRANCESCHI C, MOTTA L, VALENSIN S, RAPISARDA R, FRANZONE A, BERARDELLI M, MOTTA M, MONTI D, BONAFE M, FERRUCCI L, DEIANA L, PES GM, CARRU C, DESOLE MS, BARBA C, SARTOLI G, GEMELLI G, LESCAI F, OLIVIERI F, MARCHEGIANI F, CARDELLI M, CAVALLONE L, GUERESI P, COSSARIZZA A, TROIANO L, PINI G, SANSONI P, PASSERI G, LISA R, SPAZZAFUMO L, AMADIO L, GIUNTA S, STECONNI R, MORRESI R, VITICHI C, MATTACE R, DE BENEDICTIS G, BAGGIO G (2000). Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity? *Aging (Milano)* 12: 77 – 84.
- 52.- LIO D, BALIESTRERI CR, COLONNA-ROMANO G, MOTTA M, FRANCESCHI C, MALAGUARNERA M, CANDORE G, CARUSO C (2000). Association between the MHC class I gene HFE polymorphisms and longevity: a study in Sicilian population. *Genes and Immunity* 3: 20 – 24.

- 53.- ALTOMARE K, GRECO V, BELLIZZI D, BERERDELLI M, DATO S, DE RANGO F, ROS G, FERACO E, MARI V, PASSARINO G, FRANCESCHI C, DE BENEDICTIS G (2003). The allele (A)-110) in the promoter region of the HSP70-1 gene is unfavorable to longevity in women. *Biogerontol* 4: 215 – 220.
- 54.- STAVIJENIC-RUKAVINA A (2002). Genetics of cardiovascular disease. *J Clin Chem and Lab Medicine* 13: 1 – 4.
- 55.- BARBIERI M, RIZZO MR, MANZELLA D, GRELLA R, RAGNO E, CARBONELLA M, ABBATECOLA AM, PAOLISSO G (2003). Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians. *Exp Gerontol* 38: 137 – 143.
- 56.- RYBICKI BA, ELSON RC (2000). The relationship between the sibling recurrent-risk ratio and genotype relative risk. *Am J Hum Genet* 66: 593 – 604.
- 57.- HITT RY, YOUNG-KU Y, SILVER M, PERLS T (1999). Centenarians: the older you get, the healthier you have been. *Lancet* 354: 652.
- 58.- HERKSKIND AM, MCGUE M, HOLM NV, SORENSEN TI, HARVALD B, VAUPEL JW (1996). The heritability of human longevity: a population based study of 2872 Danish twin pairs born 1870 – 1900. *Hum Genet* 97: 319 – 323.
- 59.- TAN Q, DE BENEDICTIS G, UKRAINTSEVA SV, FRANCESCHI C, VAUPEL JW, YASHIN AI (2002). A centenarian-only approach for assessing gene-gene interaction in human longevity. *Eur J Hum Genet* 10: 119 – 124.
- 60.- PUCA AA, DALY MJ, BREWSRER SJ, MATISE EC, BARRETT J, SHEA-DRINKWATER M, KANG S, JOYCE E, NICOLI J, BENSON E, KUNKEL LM, PERLS T (2001). A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosome 4. *PNAS* 98: 10505 – 10508.
- 61.- AGERHOLM-LARSEN B, NORDESTGAARD BG, STEFFENSEN R, SORENSEN TI, JENSEN G, TYBJAERG-HANSEN A (1997). ACE gene polymorphism: ischemic heart disease and longevity in 10150 individuals. *Circulation* 95: 2358 – 2367.
- 62.- FAURE-DELANEF L, BAUDIN B, BENETEAU-BURNAT B, BEAUDOIN J-C, GIBOUDEAU J, COHEN D (1998). Plasma concentration, kinetic constants, and gene polymorphism of angiotensin I-converting enzyme in centenarians. *Clinical Chemistry* 44: 2083 – 2087.
- 63.- KEHOE PG, RUSS C, McILROY S, WILLIAMS H, HOLMANS P, HOLMES C, LIOLITSA D, VAHIDASSR D, POWELL L, MCGLEENON B, LIDDELL M, PLOMIN R (1999). Variation in DCPI, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nature Genet* 21: 71 – 72.
- 64.- CORBO RM, SCACCHI R (1999). Apolipoprotein E (APOE) alleles distribution in the world: is APOE\*4 a thrifty allele? *Ann Hum Genet* 63: 301 – 310.
- 65.- GERDES LU, JEUNE B, RANBERG KA, NYBO H, VAUPEL JW (2000). Estimation of apolipoprotein E genotypic-specific relative mortality risks from the distribution of genotypes in centenarians and middle-aged men: apolipoprotein E gene is a “frailty gene”, not a “longevity gene”. *Genet Epidemiol* 19: 202 – 210.

- 66.- GARASTO S, ROSE G, DE RANGO F, BERARDELLI M, CORSONELLO A, FERACO E, MARI V, MALETTA R, BRUNI A, FRANCESCHI C, CAROTENUTO L, DE BENEDICTIS G (2003). The study of APOA1, APOC3 and APOA4 variability in healthy ageing people reveals another paradox in the oldest old subjects. *Ann Hum Genet* 67: 54 – 62.
- 67.- DAHL M, TYBJAERG-HANSEN A, SILLESEN H, JENSEN H, JENSEN G, STEFFENSEN R, NORDESTGAARD BG (2003). Blood pressure, risk of ischemic cerebrovascular and ischemic heart disease, and longevity in Alfa-antitripsin deficiency. *Circulation* 107: 747 – 752.
- 68.- CARRELL RW, LOMAS DA (2002). Alpha-1-antitrypsin deficiency: a model for conformational diseases. *New Eng J Med* 346: 45 – 53.
- 69.- DE BENEDICTIS G, CAROTENUTO L, CARRIERI G, DE LUCA M, FALCONE E, ROSE G, CAVALCANTI S, CORSONELLO F, FERACO E, BAGGIO G, BERTOLINI S, MARI D, MATTACE R, YASHIN AI, BONAFE M, FRANCESCHI C (1998). Gene/longevity association studies at four autosomal loci (REN, THO, PARP, SOD2). *Eur J Hum Genet* 6: 534 – 541.
- 70.- BONAFE M, MARCHEGIANI F, CARDELLI M, OLIVIERI F, CAVALONE L, GIOVAGNETTI S, PIERI C, MARRA M, ANTONICELLI R, TROIANO L, GUERESI P, PASSERI G, BERARDELLI R, PAOLISSO G, BARBIERI M, TESEI S, LISA R, DE BENEDICTIS G, FRANCESCHI C (2002). Genetic analysis of paraoxonase (PON1) locus reveals an increased frequency of Arg 192 allele in centenarians. *Eur J Hum Genet* 10: 292 – 296.
- 71.- PINDERSKI-OSLUND LJ, HEDRICK CC, OLVERA T, HEGENBAUGH A, TERRITO M, BERLINER JA, FYFE AI (1999). Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2847 – 2853.
- 72.- BONAFE M, BARBIERI M, MARCHEGIANI F, OLIVIERI F, RAGNO E, GAMPIERI C, MUGIANESI E, CENTURELLI M, FRANCESCHI C, PAOLISSO G (2003). Polymorphic variants of insulin-like growth factor 1 (IGF -1) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: Cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. *Clin Endocrinol Metab* 88: 3299 – 3304.
- 73.- ABBOT HM, ABBEY H, BOLING DR, MURPHY EB (1987). The familial component in longevity: a study of offspring of nonagenarians. III Intrafamilial studies. *Am J Med Genet* 2: 109 – 120.
- 74.- DE BENEDICTIS G, ROSE G, CARRIERI G, DE LUCA M, FALCONE E, PASSARINO G, BONAFE M, MONTI D, BAGGIO G, BERTOLINI S, MARI D, MATTACE R, FRANCESCHI C (1999). Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in human. *FASEB J* 19: 1532 – 1536.
- 75.- TANAWA M, GONG J, ZHANG J, YAMADA Y, BORGELD HJ, YAGI K (2000). Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis. *Mech Ageing Dev* 116: 65 – 76.
- 76.- WALLACE DC, BROWN MD, LOTT MT (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238: 211 – 230.

- 77.- NIEMI A-K, HERVONEN A, HURME M, KARHUMEN PJ, MAJAMA AK (2003). Mitochondrial DNA polymorphisms associates with longevity in a Finnish population. *Hum Genet* 112: 29 – 33.
- 78.- BROWN MD, SUN F, WALLACE DC (1997). Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am J Hum Genet* 60: 381 – 387.
- 79.- MISHMAR D, RUIZ-PESINI E, GOLIK P, MACAULAY V, CLARK AG, HOSSEINI S, BRANDON M, EASLEY K, CHEN E, BROWN MD, SUKERNIK RI, OLCKERS A, WALLACE DC (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *PNAS* 100: 171 – 176.
- 80.- COSKUN PE, RUIZ-PESINI E, WALLACE DC (2003). Control region mtDNA variants: Longevity, climatic adaptation, and forensic conundrum. *PNAS* 100: 2174 – 2176.
- 81.- SMITH RE (1961). Thermogenic activity of the hibernating gland in the cold-acclimated rat. *Physiologist* 4: 113 – 120.
- 82.- NICHOLLS DG, LOCKE RM (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64: 1 – 64.
- 83.- BOUCHARD C, PERUSSE L, CHAGNON YC, WARDEN C, RICQUIER D (1997). Linkage between markers in the vicinity of the uncoupling protein 2 genes and resting metabolic rate in humans. *Hum Mol Genet* 6: 1887 – 1889.
- 84.- IRITANI N, SUGIMOTO T, FUKUDA H, TOMOE K (2002). Changes in UCP family expressions in rat tissues due to diet and aging. *J Nutr Sci Vitaminol* 48: 410 – 416.
- 85.- D'ADAMO M, PEREGO L, CARDELLINI M, MARINI MA, FRONTONI S, ANDREOZZI F, SCIACQUA A, LAURO D, SBRACCIA P, FEDERICI M, PAGANELLI M, PONTIROLI AE, LAURO R, PERTICONE F, FOLLI F, SESTI G (2004). The -866A/A genotype in the promoter of the human uncoupling protein 2 gene is associated with insulin resistance and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 1905 – 1910.