

El mecanismo de prolongación de la vida por restricción calórica y la intensificación farmacológica de sus efectos

E. Bergamini

Centro di Ricerca di Biologia e Patologia dell'Invecchiamento. Scuola Medica. Università di Pisa. Pisa. Italia.

RESUMEN

El valor demostrativo de la estimulación de la autofagia como contribuyente al efecto de la prolongación de la vida por restricción calórica (posiblemente también la reducción insulínica, así como de la hormona de crecimiento/factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 y la hormesis) se revisa aquí. La autofagia es el mecanismo de reparación celular causante del mantenimiento de las membranas celulares y organelas, incluyendo peroxisomas, generadores de radicales libres y mitocondrias. Se evidencia que la administración semanal continuada de un fármaco antilipolítico puede reducir los valores de glucosa e insulina, estimular la autofagia e intensificar los efectos de la restricción calórica submáxima que conducen a la prolongación de la vida.

Palabras clave

(Macro)autofagia. Degradación lisosomal. Envejecimiento. Intervención en la prolongación de la vida. Enfermedades asociadas a la edad.

The life-prolonging mechanism of calorie restriction and the pharmacological intensification of these effects

ABSTRACT

Evidence is reviewed showing that CR (and perhaps reduced insulin of GH-IGF-1 axis and hormesis) may exhibit anti-aging effects at least partly by a stimulatory action on autophagy, the cell repair mechanism responsible for the house-keeping of cell membranes and organelles including the free radical generators peroxisomes and mitochondria. It is shown that the life-long weekly administration of an anti-lipolytic drug may decrease glucose and insulin levels and stimulate autophagy and intensify the anti-ageing effects of submaximal CR.

Key words

(Macro)autophagy. Lysosomal degradation. Ageing. Anti-ageing intervention. Age-associated diseases.

Correspondencia: Ettore Bergamini. MD, PhD, Director.
Centro di Ricerca di Biologia e Patologia dell'Invecchiamento.
Scuola Medica. Via Roma 55. 56126 Pisa. Italia.

Recibido el 16-09-04; aceptado el 2-12-04.

PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento expresa con el paso del tiempo un deterioro progresivo en las células y organismos diferenciados, en el que se fundamenta una creciente vulnerabilidad ante sobrecargas externas y la disminución de la capacidad de supervivencia¹. El deterioro puede ser una consecuencia directa de los procesos de envejecimiento o una reacción secundaria. El daño oxidativo y su reparación incompleta pueden ser causas coadyuvantes fundamentales que subyacen en la senescencia asociada a una progresiva acumulación de alteraciones nocivas macromoleculares y de membrana^{2,3}. Se postula que hasta un 1-2% del oxígeno utilizado puede generar radicales de oxígeno, producidos de forma endógena por mitocondrias y peroxisomas (véanse, por ejemplo, Barja⁴ y Sohal⁵). La acumulación de lesiones en células y tejidos se debe a que la reparación, a nivel molecular (reparación de ADN, o proteólisis, sustitución de ácidos grasos fosfolipídicos), subcelular (autofagia) y a nivel celular, y de tejidos (apoptosis), no es lo suficientemente efectiva y desciende al aumentar la edad. El declive en la reparación celular puede explicar muchas alteraciones relacionadas con la edad, que incluyen el aumento de alteraciones en el ADN⁶ y proteínas⁷, los cambios en la composición fosfolipídica⁸, la acumulación de mitocondrias⁹ y peroxisomas dañadas¹⁰ así como de lípidos de membrana, como el dolicol¹¹. Todo ello conduce al progresivo aumento de células dañadas en los tejidos¹². Estas son las causas fundamentales de la acumulación de alteraciones nocivas en macromoléculas y membranas, así como del declive funcional de órganos y sistemas a medida que avanza la edad¹³.

EFFECTOS DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA

Está documentado que la restricción calórica (RC) reduce el crecimiento y el tamaño corporal, y que tiene un efecto positivo sobre el ciclo vital medio y máximo de roedores y diversas especies de invertebrados (protozoos, moscas, pulgas de agua, nematodos, rotíferos y arañas) y vertebrados (peces, hamsters, perros)¹⁴. Investigacio-

nes realizadas a lo largo de más de 60 años han demostrado que la RC es la única intervención nutricional que contrarresta de forma coherente los cambios asociados a la edad en la función de los tejidos¹⁵. Se están llevando a cabo estudios longitudinales sobre los efectos de la RC en primates no humanos. Aunque ninguno de ellos lleva en marcha el tiempo suficiente para arrojar resultados sobre la influencia de la RC en la longevidad de estos animales; no obstante, datos preliminares sugieren que la RC tendría efectos beneficiosos en la morbilidad y mortalidad¹⁶. La RC es también efectiva en la prevención del cáncer¹⁷ y retrasa la edad de aparición y/o el índice de progresión de la mayoría de enfermedades asociadas a la edad^{1,14}. Los efectos de la RC dependen tanto de la duración en su la aplicación como de la edad de comienzo. En roedores, el tratamiento es más efectivo cuando se inicia en animales jóvenes. Resulta sorprendente que respecto al aumento en un 10% de supervivencia en ratas, la RC de comienzo a los 6 meses de edad es casi tan efectiva como la RC aplicada a partir de las 6 semanas de edad¹⁸. La RC se puede iniciar en ratones de mediana edad logrando todavía un importante efecto en la prolongación de la vida¹⁹, pero algunos estudios en ratas han demostrado que la RC no aumenta la longevidad cuando se inicia a edades más avanzadas²⁰. En cuanto al grado de restricción, el máximo beneficio se da con una RC del 40% o con la ingesta en días alternos. No obstante, se obtiene una significativa, aunque menor, prolongación del período vital con una RC del 10% o un día de ayuno por semana^{21,22}. Para entender el mecanismo es fundamental recordar que todos los procedimientos de restricción calórica implican un patrón de ingesta de comida seguido de muchas horas de ayuno, y que este modo de alimentación tiene un efecto notable sobre la regulación de la macroautofagia²³, que es un mecanismo esencial de reparación celular. Las formas de las curvas de supervivencia¹⁸ indican que la RC prolonga tanto el promedio de la duración de la vida como la supervivencia máxima. La extensión del promedio del período vital no significa necesariamente que los procesos de envejecimiento se hayan ralentizado, ya que la prevención de muerte prematura incrementaría este valor, incluso sin involucrar a los procesos de envejecimiento. Por el contrario, en relación con la extensión de la supervivencia máxima, la RC muestra un efecto claro y reproducible, y está íntimamente ligado al mecanismo básico y universal del envejecimiento.

MECANISMO DE LOS EFECTOS DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA: LAS 4 HIPÓTESIS DE MASORO

La RC tiene importantes efectos beneficiosos sobre la mayoría de los cambios asociados a la edad que ocurren en las células y tejidos, y es comúnmente aceptado que ralentiza los procesos de envejecimiento ya que retarda el deterioro asociado a la edad de muchos procesos fisiológicos, e incrementa así la capacidad de un organismo pa-

ra sobrevivir como adulto a medida que aumenta la edad cronológica¹⁴. La RC afecta notablemente al peso y temperatura corporales, así como al metabolismo de la glucosa, lípidos y aminoácidos, que influyen en muchas funciones endocrinas (incluyendo la secreción de insulina, glucagón y glucocorticoides)²⁴, y contrarresta alteraciones asociadas a la edad en la señalización celular^{14,25-27}. La RC previene muchos cambios asociados a la edad a nivel molecular, subcelular, celular y de tejidos, incluyendo la acumulación de 8-OH-dG en ADN⁶ y de carbonil en proteínas^{28,29}, la alteración asociada a la edad en la composición de lípidos de las citomembranas^{8,30}, y parte de la acumulación asociada a la edad de residuos de glucosilación avanzada en el colágeno de piel y aorta³¹. En una escala temporal de mayor duración, la RC reduce el incremento asociado a la edad en la generación mitocondrial de superóxido y peróxido de hidrógeno⁹. Sin embargo, se desconoce si la RC puede mejorar el funcionamiento de las mitocondrias en todas las células y tejidos, o potenciar la degradación por separado de mitocondrias defectuosas.

En principio, los mecanismos de acción de la RC pueden indicar una protección contra el estrés oxidativo o una mejor reparación, o ambas cosas. Tomando como base todas las investigaciones publicadas, existen pocas dudas de que, a largo plazo, la RC protege del estrés oxidativo a roedores y, posiblemente, también a monos³². No obstante, ello no significa que la RC disminuya la acumulación de moléculas dañadas por oxidación en células y tejidos actuando directamente sobre la producción de especies reactivas de oxígeno. Por ejemplo, está demostrado que la RC aumenta la reparación de moléculas de ADN dañadas por oxigenación y estimula el recambio de proteínas y organelas, así como la sustitución de estructuras dañadas por aquellas otras intactas de nueva síntesis. La prevención por RC de la acumulación asociada a la edad de daños oxidativos en mitocondrias³³ puede ser importante, ya que aumentos en el escape del protón mitocondrial pueden ser tanto una causa como una consecuencia del estrés oxidativo. Cuando se combina el conocimiento actual sobre las acciones fisiológicas y los efectos de expresión génica de la RC con los hallazgos de la manipulación genética que alargan la vida de especies vertebradas e invertebradas, surgen 4 hipótesis: atenuación del daño oxidativo; cambio en el sistema glucosa-insulina; modificación del eje hormona de crecimiento (GH)/factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), y hormesis¹⁴. El reciente descubrimiento que la macroautofagia está implicada en el mecanismo del envejecimiento y en el efecto de la restricción calórica, puede encuadrar estas 4 hipótesis en un único marco.

MACROAUTOFAGIA

La macroautofagia es un proceso universal y dinámico que tiene lugar en todas las células eucariotas y comprende una reorganización de membranas subcelu-

lares para aislar citoplasma y organelas y transportarlo al lisosoma o vacuola, donde se degrada y recicla^{34,35}. La maquinaria básica para la macroautofagia es idéntica entre células de levaduras y mamíferos³⁶. La macroautofagia también se ha demostrado en plantas, y parece estar implicada en la reacción celular ante el recorte de nutrientes^{37,38}. Distintas vías de señalización controlan la macroautofagia, la síntesis de proteínas y la supervivencia de células. La macroautofagia está íntimamente relacionada con la ejecución de programas de proliferación y de muerte celular³⁹ a través de la acción de diversas cinasas, fosfatasa y guanosín trifosfato⁴⁰. El proceso es importante para mantener un equilibrio bien ajustado entre anabolismo y catabolismo, con el fin de tener un crecimiento y desarrollo celular normal bajo la regulación de condiciones extracelulares como la concentración de nutrientes y hormonas. La intensa investigación realizada en células de mamíferos durante las últimas 3 décadas ha demostrado que la macroautofagia se *activa* durante el ayuno cuando descienden los valores de aminoácidos e insulina, facilitando la producción de nutrientes a partir de fuentes endógenas. Por el contrario, dentro del margen fisiológico de la concentración de aminoácidos en plasma los valores altos (posprandiales) de insulina suprimen totalmente la macroautofagia⁴¹⁻⁴³. Curiosamente, la macroautofagia es el único mecanismo celular para la degradación de membranas y organelas alteradas, incluyendo mitocondrias⁴⁴ y peroxisomas^{45,46}. Según las premisas fisiológicas, la hipótesis de trabajo sería que la ingesta continuada *ad libitum* debe dar como resultado la supresión sostenida de macroautofagia y, por tanto, acumulación de mitocondrias, peroxisomas y componentes de membrana alterados. Por otro lado, la restricción dietética debería prevenir o retardar la aparición de estos cambios. Recientes descubrimientos de biología molecular demuestran que los genes de autofagia son esenciales para el desarrollo y prolongación del ciclo vital de *Caenorhabditis elegans*⁴⁷. La formación de vacuolas autofágicas se controla también a través de situaciones de tensión intracelular, incluyendo la agregación de proteínas mal dobladas y la acumulación de organelas alteradas, y está presente en la remodelación y atrofía celular. En conclusión, la vía de degradación que permite a la célula eliminar organelas superfluas o innecesarias y reciclar los componentes para su reutilización⁴⁸, está bajo un control permisivo a través de la nutrición y la lesión celular. La estrecha relación entre nutrición y reparación celular puede convertirse en el talón de Aquiles de la gente bien alimentada que vive en las prósperas sociedades occidentales, con una propensión al envejecimiento acelerado y la aparición de enfermedades asociadas a la edad. De aquí el planteamiento que la macroautofagia desempeña un papel fundamental en el envejecimiento y en los efectos de prolongación de la vida de la restricción calórica^{49,50}, así como en la muerte celular y las enfermedades asociadas a la edad, incluyendo enfermedades neurodegenerativas y algunas formas de cáncer⁴⁰.

DEMOSTRACIÓN DE QUE LA AUTOFAGIA PUEDE MEDIAR EN LOS EFECTOS DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA

Hemos conseguido pruebas que la macroautofagia puede estar implicada en el proceso de envejecimiento, siendo el mejor mediador de los efectos de la RC^{51,52}. En primer lugar, en ratas alimentadas *ad libitum*, la reacción macroautofágica inducida *in vivo* disminuía notablemente a partir de los 6 meses de edad y era prácticamente desdéniable en ratas más viejas⁵³. Es más, la tasa de máxima proteólisis macroautofágica en células hepáticas aisladas incubadas *in vitro* (sin aminoácidos añadidos en el medio), se reducía a partir de los 6 meses de edad⁵⁴. En segundo lugar, la RC protegía contra estos cambios, tanto *in vivo*⁵³, como *in vitro*⁵⁵ y mejoraba la respuesta de las células hepáticas a la insulina y glucagón de manera significativa. En tercer lugar, la protección por RC ante el declive de proteólisis autofágica asociado a la edad se correlacionaba con la esperanza de vida⁵⁶. Además, se obtuvieron pruebas de que el declive asociado a la edad de la macroautofagia en ratas alimentadas *ad libitum* se relacionaba con un deterioro progresivo de membranas celulares. Efectivamente, se observó una acumulación significativa de dolicol asociada a la edad en tejidos de rata de más de 6 meses de edad^{30,57,58} que se veía retardada significativamente mediante la RC^{30,58} mostrando una correlación con la esperanza de vida y la función macroautofágica de proteólisis^{56,59}. Se concluye que la alteración reguladora asociada a la edad de la macroautofagia condicionada por los valores plasmáticos de aminoácidos, glucagón y corticosterona, que determinan la tasa de recambio de membranas y organelas, así como la acumulación de componentes celulares dañados, se puede frenar o intensificar, respectivamente, mediante un valor bajo o alto de ingesta.

INTERVENCIÓN FARMACOLÓGICA: FÁRMACOS QUE MODULAN LA MACROAUTOFAGIA PUEDEN MODIFICAR ADECUADAMENTE EL RITMO DE ENVEJECIMIENTO

Con la finalidad de explorar la hipótesis que el ritmo de macroautofagia podría influir en la tasa de envejecimiento, se redujo la función autofágica-lisosomal con la inyección de inhibidores de tiolproteasas (p. ej., leupeptina) y agentes lisosomotrópicos como cloroquina, inhibidores generales de enzimas lisosomales⁶⁰. La inhibición farmacológica crónica de la proteólisis autofágica indujo la formación de agregados lisosomales muy semejantes a la ceroidlipofusina⁶¹, lo que subraya la validez de la inhibición proteolítica como modelo de envejecimiento⁶². Por otro lado, el incremento de la proteólisis autofágica mediante un agente antilipolítico administrado en animales en período de ayuno es un método seguro y altamente reproducible que permite el estudio, bajo condiciones convenientemente fisiológicas, de los efectos sobre el envejecimiento de la macroautofagia inducida hormonalmente (valores bajos de insulina y altos de glucagón)^{63,64}. Así, el

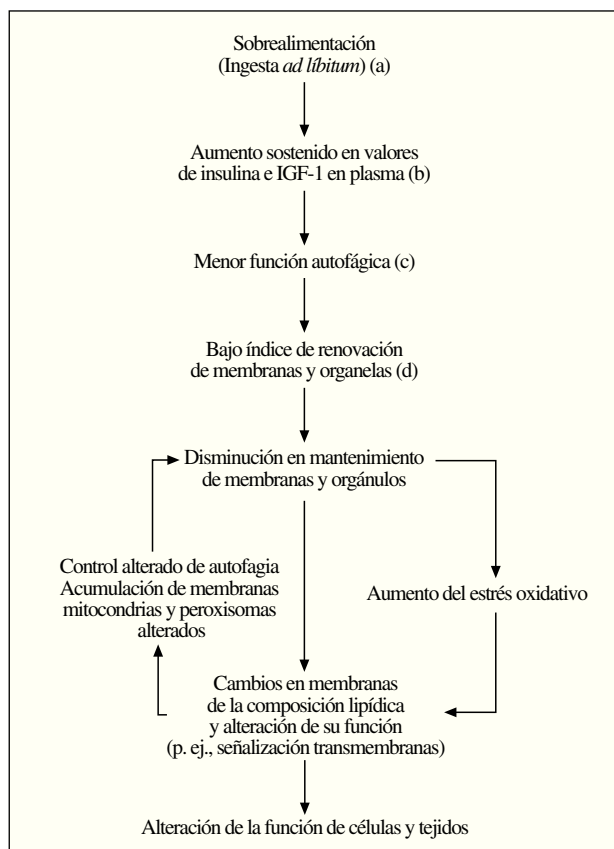


Figura 1. a) Prevención por restricción calórica; b) prevención por modificación genética de la estructura insulínica y del eje GH/IGF-1; c) prevención en ratones FIRKO78 y por administración de fármacos antilipolíticos, y d) inducible por estresores de baja intensidad (hormesis).

Fuente: modificado, con permiso, de Bergamini et al⁷⁹.

tratamiento agudo causaba una degradación importante en organelas aisladas seleccionadas de células hepáticas, incluyendo peroxisomas y, a menor escala, en mitocondrias⁶⁵. Los resultados preliminares mostraron que el tratamiento semanal a largo plazo con agentes antilipolíticos intensifica los efectos beneficiosos de una ligera restricción calórica del 10% (ayuno un día a la semana), sobre parámetros que, como es conocido, se correlacionan con la esperanza de vida⁶⁶. En conclusión, se encontró una manera de intensificar farmacológicamente el efecto de la dieta sobre el proceso de envejecimiento⁶⁷.

LA AUTOFAGIA PUEDE MEDIAR EN LOS EFECTOS DE LA DISRUPCIÓN GENÉTICA SOBRE EL EJE DE INSULINA IGF-1 Y LA HORMESIS

A pesar de que todavía faltan pruebas experimentales, el conocimiento de la fisiología invita a plantear que los cambios inducidos hormonalmente en la macroautofagia podrían explicar los efectos de inyección crónica de insu-

lina exógena, invirtiendo los beneficios de la RC respecto a la alteración mitocondrial⁶⁸, y también los efectos de intervenciones génicas que alteran las vías de señalización de la insulina GH/IGF-1, mediante la reducción del crecimiento y el tamaño, y la prolongación de la longevidad del organismo⁶⁹. En cuanto a la hormesis, con la ayuda del microscopio electrónico se han encontrado pruebas que varios estresores (ayuno, inyecciones de cortisol, inyecciones de reserpina, encierro, transección de médula espinal, inmersión en agua caliente, exposición al frío y al ejercicio muscular forzado en un tambor giratorio, restricciones físicas) pueden inducir la formación de vacuolas autofágicas junto con un aumento significativo de corticosterona en plasma e hipotermia^{70,71}, y que estos efectos pueden cambiar con la edad⁷². En conclusión, la activación de la macroautofagia y consiguiente eliminación de mitocondrias y peroxisomas alterados puede ser el denominador común de las 4 hipótesis de Masoro sobre los mecanismos de los efectos de la RC contra el envejecimiento.

CONCLUSIONES

La ingesta *ad libitum* (p. ej., sobrealimentación) puede afectar negativamente la longevidad al aumentar la glucosa en plasma, la secreción de insulina y los valores de aminoácidos e IGF-1, ya que estos cambios metabólicos y endocrinos inhiben la macroautofagia y ralentizan la tasa de recambio de proteínas de larga vida, membranas y organelas. Así, la mayor permanencia de macromoléculas y estructuras celulares puede incrementar la acumulación de macromoléculas peroxidadas y organelas defectuosas en las células, acelerando el proceso de envejecimiento. La acumulación de membranas⁷³, mitocondrias^{74,75} y peroxisomas alterados^{76,77} podría aumentar la producción de radicales libres y de lesiones celulares. La mayor formación de radicales libres, la alteración de ese metabolismo en membranas y de la señalización celular puede iniciar un círculo vicioso que en algún caso convierta los cambios celulares en irreversibles (fig. 1)⁵⁰. Por el contrario, la restricción calórica, el ejercicio físico, las disrupciones genéticas de la insulina y del eje GH/IGF-1, así como los estresores de baja intensidad, pueden disminuir los valores de insulina e IGF-1, y aumentar los de glucagón y corticosterona. De esta forma, mediante la estimulación de la macroautofagia se podría prevenir la acumulación de macromoléculas y componentes subcelulares alterados, lo que prolongaría la duración de la vida. Finalmente, estos efectos estarían también al alcance de una intervención farmacológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Masoro E. Challenges of biological aging. New York: Springer; 1999.
2. Troen BR. The biology of aging. Mt Sinai J Med. 2003;70:3-22.
3. Weindruch R, Sohal RJ. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. N Engl J Med. 1997;337:986-94.
4. Barja G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. Ageing Res Rev. 2002;1:397-411.

5. Sohal RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:37-44.
6. Sohal RS, Agarwal S, Candas M, Foster MJ, Lal H. Effect of age and calorie restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev*. 1994;76:215-24. Cerami A. Hypothesis. Glucose as a mediator of aging. *J Am Geriatr Soc*. 1985;33:626-34.
7. Gafni A. Protein structure and turnover. En: Masoro EJ, Austad SN, editors. *Handbook of the biology of aging*. 5th ed. San Diego: Academic Press; 2001. p. 59-83.
8. Tamburini I, Quartacci M, Izzo R, Bergamini E. Effects of caloric restriction on age-related changes in the phospholipid fatty acid composition of various rat tissues. *Aging (Milano)*. 2004. En prensa.
9. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Foster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation, and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev*. 1994;76:121-33.
10. Perichon R, Bourre JM, Kelly JF, Roth GS. The role of peroxisomes in aging. *Cell Mol Life Sci*. 1998;54:641-52.
11. Parentini I, Cavallini G, Donati A, Gori Z, Bergamini E. The accumulation of dolichol in older tissues satisfies the proposed criteria to be qualified a biomarker of aging. *J Gerontol*. 2004. En prensa.
12. Warner HR, Fernandes G, Wang E. A unifying hypothesis to explain the retardation of aging and tumorigenesis by calorie restriction. *J Gerontol*. 1995;50A:B107-9.
13. Shock NW, editor. *Normal human aging: the Baltimore Longitudinal Study of Aging (NIH Publ No 84-2550)*. Washington: US Government Printing Office; 1984.
14. Masoro EJ. Caloric restriction: a key to understanding and modulating aging. En: Viig J, editor. *Research profiles in aging*. Amsterdam: Elsevier; 2002.
15. Payne AM, Dodd SL, Leeuwenburgh C. Life-long calorie restriction in Fischer 344 rats attenuates age-related loss in skeletal muscle-specific force and reduces extracellular space. *J Appl Physiol*. 2003;95:554-62.
16. Mattison JA, Lane MA, Roth GS, Ingram DK. Calorie restriction in rhesus monkeys. *Exp Gerontol*. 2003;38:35-46.
17. Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN, Barrett JC. Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annu Rev Med*. 2003;54:131-52.
18. Yu BP, Masoro EJ, McMahan CA. Nutritional influences on aging of Fisher 344 rats. I. Physical, metabolic and longevity characteristics. *J Gerontol*. 1985;40:657-70.
19. Weindruch R, Walford RL. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science*. 1982;215:1415-8.
20. Lipman RD, Smith DE, Blumberg JB, Bronson RT. Effects of caloric restriction or augmentation in adult rats: longevity and lesion biomarkers of aging. *Aging (Milano)*. 1998;10:463-70.
21. Duffy PH, Seng JE, Lewis SM, Mayhugh MA, Aidoo A, Hattan DG, et al. The effects of different levels of dietary restriction on aging and survival in the Sprague-Dawley rat: implications for chronic studies. *Aging Clin Exp Res*. 2001;13:263-72.
22. Cavallini G, Donati A, Gori Z, Parentini I, Bergamini E. Low level dietary restriction retards age-related dolichol accumulation. *Aging Clin Exp Res*. 2002;14:152-4.
23. Mortimore GE, Khurana KK, Miotto G. Amino acid control of proteolysis in perfused livers of synchronously fed rats. Mechanism and specificity of alanine co-regulation. *J Biol Chem*. 1991;266:1021-8.
24. Del Roso A, Vittorini S, Cavallini G, Donati A, Gori Z, Masini M, et al. Ageing-related changes in the in vivo function of rat liver macroautophagy and proteolysis. *Exp Gerontol*. 2003;38:519-27.
25. Ando K, Higami Y, Tsuchiya T, Kanematsu T, Shimokawa I. Impact of aging and life-long calorie restriction on expression of apoptosis-related genes in male F344 rat liver. *Microsc Res Tech*. 2002;59:293-300.
26. Hansen BC. Introduction. Symposium. Calorie restriction: effects on body composition, insulin signaling and aging. *J Nutr*. 2001;131:S900-2.
27. Ikeyama S, Kokkonen G, Martindale JL, Wang XT, Gorospe M, Holbrook NJ. Effects of aging and calorie restriction of Fischer 344 rats on hepatocellular response to proliferative signals. *Exp Gerontol*. 2003;38:431-9.
28. Askenova MV, Askenov MY, Carney JM, Rutterfield DA. Protein oxidation and enzyme activity decline in old Brown Norway rats are reduced by dietary restriction. *Mech Ageing Dev*. 1998;100:157-68.
29. Vittorini S, Paradiso C, Donati A, Cavallini G, Masini M, Gori Z, et al. The age-related accumulation of protein carbonyl in rat liver correlates with the age-related decline in liver proteolytic activities. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1999;54:B318-23.
30. Marino M, Dolfi C, Paradiso C, Cavallini G, Masini M, Gori Z, et al. Age-dependent accumulation of dolichol in rat liver: is tissue dolichol a biomarker of aging? *J Gerontol Biol Sci Med Sci*. 1998;53:B87-93.
31. Novelli M, Masiello P, Bombara M, Bergamini E. Protein glycation in the aging male Sprague-Dawley rat: effects of antiaging diet restrictions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1998;53:B94-101.
32. Zainal Y, Oberly TD, Allison DB, Szewda U, Weindruch R. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. *FASEB J*. 2000;14:1825-36.
33. Lass A, Sohal BH, Weindruch R, Forster MJ, Sohal RS. Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 1988;25:1089-97.
34. Wang CW, Klionsky DJ. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med*. 2003;9:65-76.
35. Kanazawa T, Taneike I, Akaishi R, Yohizawa F, Furuya N, Fujimura S, et al. Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 2004;279:8452-9.
36. Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryotic Cell*. 2002;1:11-21.
37. Chen MH, Liu LF, Chen YR, Wu HK, Yu SM. Expression of alpha-amylase, carbohydrate metabolism and autophagy in cultured rice cells is coordinately regulated by sugar nutrients. *Plant J*. 1994;6:625-36.
38. Aubert SE, Gout E, Bligny R, Marty-Mazars D, Barriau F, Alabouvette J, et al. Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plants subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J Cell Biol*. 1996;133:1251-63.
39. Petiot A, Pattingre S, Arico S, Meley D, Codogno P. Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct Funct*. 2002;27:431-41.
40. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 2000;290:1717-21.
41. Mortimore GE, Poso RA. Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu Rev Nutr*. 1987;7:539-64.
42. Mortimore GE, Poso RA, Lardeux BR. Mechanism and regulation of protein degradation in liver. *Diabetes Metab Rev*. 1989;5:49-70.
43. Seglen PO, Bohley P. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia*. 1992;48:158-72.
44. Stevens A, Lowe J, editors. *Pathology*. London: Mosby; 2000.
45. Locci Cubeddu T, Masiello P, Pollera M, Bergamini E. Effects of antilipolytic agents on rat liver peroxisomes and peroxisomal enzyme activities. *Biochim Biophys Acta Physiol*. 1985;839:96-104.
46. Yokota S. Degradation of normal and proliferated peroxisomes in rat hepatocytes: regulation of peroxisomes quantity in cells. *Microsc Res Tech*. 2003;61:151-60.
47. Meléndez A, Tallacz Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, Levine B. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*. 2003;301:1387-91.
48. Kim J, Klionsky DJ. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:303-42.
49. Bergamini E. Protein degradation and modification. Introduction and overview. *Ann NY Acad Sci*. 1992;663:43-7.
50. Bergamini E, Gori Z. Towards an understanding of the biological mechanism of dietary restriction: a signal transduction theory of aging. *Aging Clin Exp Res*. 1995;7:473-5.
51. Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z. Insulin, food restriction and extension of life-span: the mechanism of longevity. *Eur J Endocrinol*. 2004;150:95.
52. Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z. The antiageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomed Pharmacother*. 2003;57:203-8.
53. Del Roso A, Vittorini S, Cavallini G, Donati A, Gori Z, Masini M, et al. Ageing-related changes in the in vivo function of rat liver macroautophagy and proteolysis. *Exp Gerontol*. 2003;38:519-27.
54. Donati A, Cavallini G, Paradiso C, Vittorini S, Pollera M, Gori Z, et al. Age-related changes in the regulation of autophagic proteolysis in rat isolated hepatocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56:B288-93.

55. Donati A, Cavallini G, Paradiso C, Vittorini S, Pollera M, Gori Z, et al. Age-related changes in the autophagic proteolysis of rat isolated liver cells: effects of antiaging dietary restrictions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56:B375-83.
56. Cavallini G, Donati A, Gori Z, Pollera M, Bergamini E. The protection of rat liver autophagic proteolysis from the age-related decline co-varies with the duration of anti-ageing food restriction. *Exp Gerontol*. 2001;36:497-506.
57. Kalén A, Appelqvist EL, Dallner G. Age-related changes in the lipid composition of rat and human tissues. *Lipids*. 1989;24:579-84.
58. Cavallini G, Dolfi C, Donati A, Maccheroni M, Parentini I, Gori Z, et al. Effects of increasing age on tissue dolichol levels in ad libitum fed and food restricted rats. *Biogerontology*. 2003;4:341-5.
59. Dolfi C, Bergamini E, Carresi C, Cavallini G, Donati A, Maccheroni M, et al. The age-related accumulation of dolichol in rat liver may correlate with expectation of life. *Biogerontology*. 2003;4:113-8.
60. Ivy GO, Schottler F, Wenzel J, Baudry M, Linch G. Inhibitors of lysosomal enzymes: accumulation of lipofuscin-like dense bodies in the brain. *Science*. 1984;226:985-7.
61. Ivy GO, Kanai S, Ohta M, Smith G, Sato Y, Kobayashi M, et al. Lipofuscin-like substances accumulate rapidly in brain, retina and internal organs with cysteine protease inhibition. *Adv Exp Med Biol*. 1989;266:31-45.
62. Kitani K, Ohta M, Kanai S, Nokubo M, Sato Y, Otsubo K, et al. Morphological, physiological and biochemical alterations in livers of rodents induced by protease inhibitors: a comparison with old livers. *Adv Exp Med Biol*. 1989;266:75-92.
63. Bergamini E, Del Roso A, Fierabracci V, Gori Z, Masiello P, Masini M, et al. A new method for the investigation of endocrine-regulated autophagy and protein degradation in rat liver. *Exp Mol Pathol*. 1993;59:13-26.
64. Bergamini E, Del Roso A, Gori Z, Masiello P, Masini M, Pollera M. Endocrine and amino acid regulation of liver macroautophagy and proteolytic function. *Am J Physiol*. 1994;266:G112-22.
65. Locci Cubeddu T, Masiello P, Pollera M, Bergamini E. Effects of antilipolytic agents on rat liver peroxisomes and peroxisomal oxidative activities. *Biochim Biophys Acta Physiol*. 1985;839:96-104.
66. Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z. Can we give human the benefits of anti-ageing diet restriction without any inconvenience? *G Gerontol*. 2002;50:181-4.
67. Bergamini E. In response to: «Is there an antiaging medicine?». *J Gerontol Biol Sci Med Sci*. 2003;58:483.
68. Lambert AJ, Wang B, Merry BJ. Exogenous insulin can reverse the effects of caloric restriction on mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316:1196-201.
69. Tatar M, Barke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science*. 2003;299:1346-51.
70. Salas M, Tuchweber B, Kourounakis P, Selye H. Temperature-dependence of stress-induced hepatic autophagy. *Experientia*. 1977;33:612-4.
71. Salas M, Tuchweber B, Kourounakis P. Liver ultrastructure during acute stress. *Pathol Res Pract*. 1980;167:217-33.
72. Salas M, Tuchweber B. Influence of age on stress-induced hepatic ultrastructural alterations in the rat. *Exp Gerontol*. 1978;13:213-25.
73. De Cabo R, Caballo R, López-Lluch G, Ingram DK, Lane MA, Navas P. Calorie restriction attenuates age-related alteration in the plasma membrane antioxidant system in rat liver. *Exp Gerontol*. 2004;39:297-304.
74. Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Eur J Biochem*. 2002;269:1996-2002.
75. Huang H, Manton KG. The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Biosci*. 2004;9:110-7.
76. Legakis JE, Koepke JI, Jedeszko C, Barlasak F, Terlecky LJ, Edwards HJ, et al. Peroxisome senescence in human fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2002;13:4243-55.
77. Badr MZ, Birnbaum LS. Enhanced potential for oxidative stress in livers of senescent rats by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist perfluorooctanoic acid. *Mech Ageing Dev*. 2004;125:69-75.
78. Bluher M, Kahn BB, Kahn CR. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*. 2003;299:572-4.
79. Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z. The anti-ageing mechanism of calorie restriction. *G Gerontol*. 2002;50:135-9.