

Investigación experimental sobre envejecimiento: del falso conocimiento a la verdadera ignorancia

V.N. Anisimov

Departamento de Carcinogénesis y Oncogerontología. Instituto de Investigación Oncológica N.N. Petrov. San Petersburgo. Rusia.

RESUMEN

Este trabajo revisa varios «puntos conflictivos» de la gerontología actual, como la búsqueda de los genes de la longevidad, el papel en el envejecimiento del estrés oxidativo y el de las vías de señalización de insulina IGF-1, la participación en el envejecimiento celular y el cáncer de los telómeros y las telomerasas, y la función de la glándula pineal en el proceso de envejecimiento y el cáncer. Se ha publicado en los últimos años una gran cantidad de artículos y excelentes documentos de investigación sobre estos temas. Creemos que el entusiasmo que han provocado los nuevos descubrimientos debe ser compensado por un sano escepticismo, como indica el sofisma de Sócrates: cuando aumenta nuestro conocimiento, obligatoriamente aumenta nuestro desconocimiento.

Palabras clave

Gerontología actual. Genes de la longevidad. Envejecimiento del estrés oxidativo.

Experimental ageing research: from false knowledge to true ignorance

ABSTRACT

The present study reviews several controversial areas of current gerontology, such as the search for longevity genes, the role of oxidative stress in ageing and that of insulin/insulin-like growth factor-1 (IGF-1) signalling pathways, the contribution of telomeres and telomerases in cellular ageing and cancer, and the function of the pineal gland in the process of ageing and cancer. In the last few years, a large number of articles and high-quality research studies have been published on these subjects. We believe that the

enthusiasm stimulated by these new findings should be counterbalanced by healthy scepticism, as expressed by Socrates' sophism: as our knowledge increases, so necessarily does our lack of knowledge.

Key words

Current gerontology. Longevity genes. Oxidative stress ageing.

GENÉTICA DEL ENVEJECIMIENTO

Hay algunos argumentos que sugieren la existencia de genes que pueden afectar a la longevidad¹. Los genes de la longevidad se pueden manifestar de diversas formas. Así, la escisión total o parcial de algunos genes, por un lado, y la supraexpresión del gen o de un alelo en concreto, por el otro, pueden incrementar o disminuir las expectativas de vida. Butler et al² sugieren que estos genes se pueden clasificar en distintas categorías teóricas. Estas categorías incluyen:

- Genes que «causan» el envejecimiento.
- Genes que alteran la longevidad porque modifican el riesgo de una precoz aparición de alteraciones y enfermedades.
- Genes que afectan al tipo de individuo mayor que uno es.
- Genes que amplían la esperanza de vida o el máximo ciclo vital.
- Formación natural de alelos y combinaciones de alelos que alteran la esperanza de vida porque afectan al envejecimiento.
- Genes candidatos a influir en el ritmo del envejecimiento a causa del funcionamiento de las proteínas que codifican dichos genes (también llamados «genes de garantía de longevidad»).
- Genes que influyen en las diferencias de esperanza de vida entre especies. Hay varios síndromes de envejecimiento acelerado (progeria) en los humanos, que están

Correspondencia: V.N. Anisimov.

Departamento de Carcinogénesis y Oncogerontología. Instituto de Investigación Oncológica N.N. Petrov.
Pesochny-2. 197758 San Petersburgo. Rusia.
Correo electrónico: aging@mail.ru

Traducción: M. Jesús Rivas.
Gerontólogo.

Recibido el 1-07-03; aceptado el 15-03-04.

genéticamente determinados: Werner, Hutchinson-Gilford, Down, Blum, Rothmund-Thomson, etc.³.

El análisis de distintos modelos de roedores transgénicos y de los llamados *knock out* (ratones que carecen de un gen determinado) caracterizados por la disminución o extensión del ciclo vital proporciona una oportunidad única para evaluar el papel que desempeñan los genes implicados en el envejecimiento en los mecanismos de aparición de tumores cancerígenos. Sólo algunos modelos representan ejemplos de extensión del ciclo vital^{4,5}. El ratón mutante enano de Ames, el ratón *Igf1r^{+/−}* y FIRKO, el ratón *knock out p66^{−/−}*, αMUPA y MGMT, los ratones transgénicos viven más tiempo que las variedades salvajes. La incidencia de tumores espontáneos en estos ratones era normalmente similar a la de los ratones de control, mientras que el período latente de desarrollo del tumor aumentaba. Prácticamente todos los modelos de envejecimiento acelerado muestran el incremento de la incidencia de tumores y la reducción del período de latencia⁴. Este fenómeno se ha observado tanto en animales que presentan un fenotipo más parecido al envejecimiento natural como en animales que muestran sólo características parciales del proceso normal de envejecimiento. Estas observaciones concuerdan con los datos sobre la correlación positiva entre la incidencia de tumores y el ritmo de su aumento según la edad y el índice de envejecimiento en una población^{6,7}. En la tabla 1^{14,84-91} se presenta la relación de genes asociados a un aumento del ciclo vital en diferentes especies. Teniendo en cuenta la variedad de genes que modifican el envejecimiento, parece improbable que haya un único gen o unos pocos que controlen en solitario el envejecimiento y la mayoría de sus características fenotípicas en los animales.

ESTRÉS OXIDATIVO, ENVEJECIMIENTO Y ANTIOXIDANTES

La propuesta de utilizar antioxidantes como geroprotectores se basa en la teoría del envejecimiento por los radicales libres⁸. Esta teoría afirma que las diversas reacciones oxidativas que ocurren en un organismo (principalmente en la mitocondria) generan radicales libres como subproductos que causan múltiples lesiones en macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas y lípidos), que conducen a su deterioro y envejecimiento. Esta teoría no sólo explica el mecanismo del envejecimiento *per se*, sino también una amplia variedad de enfermedades asociadas a la edad: cardiovasculares, disfunciones cerebrales y del sistema inmunológico, cataratas, cáncer y algunas otras⁹. Al generarse principalmente en la mitocondria, las moléculas de superóxido (O_2^-), H_2O_2 , radical hidroxil (HO^-) y posiblemente del propio oxígeno ($\cdot H_2$), llamadas en general especies de oxígeno reactivo (ROS), podrían dañar a membranas celulares, colágeno, cromatina, proteínas estructurales, así como participar en la regulación epigenética de la expresión génica nuclear y mitocondrial, conduciendo a la metilación del ADN, a la alteración de la concentración intracelular de calcio, a la activación de apoptosis en cascada, etc.^{8,10}. La mayoría de los efectos potencialmente nocivos se neutralizan antes de dañar a los componentes celulares. Algunas enzimas (superóxido dismutasa [SOD], catalasa, glutatión-peroxidasa) y vitaminas (E, C) son elementos fundamentales para el sistema de defensa antioxidante de un organismo.

Se ha demostrado la correlación positiva entre la actividad de SOD, el valor de β-carotina, α-tocoferol y ácido úrico en suero sanguíneo, y el potencial vital de especies

TABLA 1. Ejemplos de genes que modifican la longevidad

Especies	Gen	Función	Modificación gen	Efecto longevidad	Autor y referencia bibliográfica
<i>D. melanogaster</i>	V-Ha-ras <i>Mth</i>	Oncogén viral Homólogo de la proteína receptora de GTP de la membrana	Superexpresión <i>Mth</i> mutación	+100% +35%	Chen et al ⁸⁴ Lin et al ⁸⁵
	<i>sod-1</i>	Cu/Zn-superóxido dismutasa	Superexpresión en motoneuronas	+ 40%	Parkes et al ¹⁴
	<i>age 1/ daf23</i> <i>daf-2</i>	Phosphatidyl-inositol-3-kirasa Receptor insulina humana gen homologado	Mutación en <i>age 1</i> Mutación en <i>daf2</i>	+100% +100%	Morris et al ⁸⁶ Kimura et al ⁸⁷
Ratón	Tioredoxina <i>p66^{shc}</i>	Grupos oxidativos restaurados en proteína Proteína adaptadora tensión oxidativa	Superexpresión <i>Knock out</i>	+30% +30%	Mitsui et al ⁸⁸ Migliaccio et al ⁸⁹
	<i>Igf1r</i> Células humanas	Receptor IGF-1 Subunidad catalítica de la telomerasa	<i>Knock out</i> Superexpresión	+33% Aumento doble número	Holzenberger et al ⁹⁰ Bodnar et al ⁹¹
TERT					

específicas¹¹. La expresión de SOD, catalasa, glutatión-peroxidasa y xantina-deshidrogenasa era mayor en las variedades de *D. melanogaster* más duraderas en comparación con las que vivían menos tiempo¹². La supraexpresión de SOD y catalasa causaba un incremento del período vital de un 20-40% y un aumento de resistencia al estrés en moscas de la fruta transgénicas^{13,14}. El tratamiento del *C. elegans* con SOD/catalasa miméticas aumentaba su ciclo vital en un 44%¹⁵. Sin embargo, la supraexpresión de SOD no alarga la vida en los ratones transgénicos¹⁶.

Se han publicado trabajos sobre la actividad geroprotectora de ciertos antioxidantes; por ejemplo, hidrocloruro 2-mercaptopoetanol, etoxiquin, ácido ascórbico, hidroxitolueno butilado ((2,6-ditert-butil-4-metilfenol [BHT]), hidroxianisol butilado (BHA), vitamina E, coenzima Q10, selenio, β-carotina, retinol y algunos otros. Al mismo tiempo, había pruebas de que el BHT inducía el desarrollo de tumores de diversa localización en ratones, ratas y hámsters^{17,18}. Se anunció que la terapia con el antioxidante etoxiquin producía lesiones preneoplásicas de riñón y aceleraba el envejecimiento en ratas¹⁹. El suplemento de α-tocoferol (vitamina E) a dosis altas reducía la incidencia de tumores espontáneos malignos, en tanto que aumentaba la incidencia de tumores benignos²⁰. Se demostró que la vitamina E mejoraba la carcinogénesis intestinal *murine* inducida por 1,2-dimetilhidracina²¹. Dos de los 3 retinoides investigados aumentaban el índice de adenomas en islotes pancreáticos, y uno de ellos reducía la incidencia de tumores espontáneos de piel²². La incidencia de tumores espontáneos en animales tratados con selenio no difería de los valores de control hasta el final de su segundo año de vida, pero esos valores se sobrepasaban significativamente en ratas de más de 30 meses. La incidencia de tumores malignos aumentaba en la mayor parte de los casos²³. Hay datos que indican el desarrollo de tumores hepáticos en ratas a las que se aplicaba una dieta rica en selenio²⁴.

De todo ello se deduce que los antioxidantes investigados como geroprotectores producen distintos efectos sobre la carcinogénesis espontánea; en algunos casos aumenta la incidencia de tumores. Merece la pena resaltar que los datos epidemiológicos y los resultados clínicos sobre la capacidad de los antioxidantes para reducir la morbilidad en general no han proporcionado ninguna prueba de su efectividad²⁵. A excepción de la vitamina E y, posiblemente, la vitamina C (que reduce la peroxidación lipídica), no hay pruebas significativas de los efectos protectores de los antioxidantes en los humanos²⁵.

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN EL ENVEJECIMIENTO Y EN EL CÁNCER

La posible conexión entre el envejecimiento y la señalización de insulina/IGF-1 ha atraído mucha atención en los últimos años, sobre la base de pruebas que incluyen el aumento asociado a la edad de la incidencia de resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2 en síndromes de envejeci-

miento acelerado y la prolongación de la vida gracias a la restricción calórica en roedores. Una reducción semejante de los valores de insulina y de glucosa en el plasma, lo que implica un aumento de sensibilidad a la insulina, surge como distintivo del incremento de la longevidad^{26,27}. La hiper glucemia es un factor importante del envejecimiento implicado en la aparición de productos finales de glucosilación avanzada (AGE)²⁸. Está demostrado que el hiperinsulinismo favorece la acumulación de proteínas oxidadas al reducir su degradación, además de facilitar la oxidación proteínica al aumentar el estrés oxidativo²⁸. Los diabéticos sin tratamiento con valores de glucosa elevados muestran muchas manifestaciones de avanzado envejecimiento, como dificultad en la curación de las heridas, cataratas, lesiones vasculares y microvasculares²⁹. Se ha observado que los centenarios, en comparación con otras personas de edad avanzada, conservan la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, además de presentar un menor grado de estrés oxidativo³⁰.

Es fundamental insistir en que el hiperinsulinismo es un factor importante, no sólo en el envejecimiento, sino también en la aparición del cáncer^{29,31,32}.

En organismos que van desde levaduras hasta roedores, la restricción calórica y las mutaciones en las vías de señalización de insulina/IGF-1 prolongan la vida^{5,26,27,33}. Ambas intervenciones presentan algunos efectos secundarios; por ejemplo, la restricción en la ingesta de calorías aumenta la concentración sérica de glucocorticoides y disminuye la resistencia a las infecciones³⁴. Además, las modificaciones génicas que afectan a la vía de señalización de insulina/IGF-1 causan obesidad, enanismo y lesiones cardíacas y pulmonares³³. Al repasar los datos disponibles sobre beneficios y efectos adversos de la restricción calórica y las modificaciones génicas, Longo y Finch³³ proponían 3 categorías de fármacos que podrían prevenir o posponer la aparición de enfermedades asociadas a la edad, así como prolongar la vida: fármacos que condicen mutaciones de enanismo, por tanto, disminuyan la producción pituitaria de somatotropina (GH); que actúen contra la secreción hepática de IGF-1, o que disminuyan la acción de IGF-1 sobre las dianas intracelulares o extracelulares. Actualmente hay un gran interés por el concepto de mimetizar la restricción calórica^{35,36}. Mimetismos de restricción calórica implican medidas que producen efectos fisiológicos en contra del proceso de envejecimiento, como los causados por la propia restricción calórica. Como se revisa en este trabajo, la relación en mamíferos del efecto sobre la longevidad de modificaciones de la vía de señalización de insulina/IGF-1 de origen genético o farmacológico con la carcinogénesis demuestra la importancia del papel de la regulación insulínica en el envejecimiento y cáncer.

Hace varios años se propuso utilizar fármacos antidiabéticos de la familia de las biguanidas como un posible tratamiento contra el envejecimiento²⁹. Se observó que

los fármacos antidiabéticos fenformina (1-feniletilbiguanide), buformina (1-butilbiguanida hidroclorido) y metformina (N,N-dimetilbiguanide) servían para reducir la hiper glucemia, mejorar la utilización de la glucosa, disminuir la utilización de ácidos grasos libres, la gluconeogénesis, los lípidos séricos, la insulina, el IGF-1, reducir peso corporal y disminuir la inmunodepresión metabólica, tanto en humanos como en roedores^{29,37,38}. Actualmente no se usa fenformina en la práctica clínica, debido a los efectos secundarios (acidosis láctica, sobre todo) observados en pacientes con diabetes descompensada. Cabe destacar que durante más de 10 años de experiencia en la administración de fenformina a pacientes con diabetes de curso moderado, Dilman²⁹ no observó casos de acidosis láctica ni ningún otro efecto secundario.

En experimentos en los que se añadió buformina en distintas concentraciones (de 1,0 a 0,00001 mg/ml) al medio nutriente durante la fase de larva y la vida de *C. elegans*, la concentración de 0,1 mg/ml prolongó el ciclo vital medio del gusano en un 23,4% ($p < 0,05$) y su ciclo vital máximo en un 26,1% en comparación con el grupo de control³⁹.

Además, utilizando modelos demográficos de mortalidad estandarizados, se volvieron a calcular y a analizar los resultados sobre los efectos de antidiabéticos biguanídicos (fenformina y buformina) de anteriores estudios experimentales en la duración de la vida y la incidencia de tumores espontáneos en ratones y ratas⁴⁰. El tratamiento crónico de hembras del ratón C3H/Sn con fenformina prolongaba su período vital medio en un 21,1% ($p < 0,05$) y el máximo en 5,5 meses (26%) en comparación con el grupo de control. El índice de envejecimiento demográfico representado por el cálculo del respectivo parámetro de Gompertz disminuía en un 31,2%, y el MRDT se incrementaba en 1,45 veces. El tratamiento inhibía de manera significativa (4,0 veces; $p < 0,01$) la incidencia de adenocarcinomas mamarios en ratones. La administración de fenformina a ratas LIO no afectaba a su período vital medio. Al mismo tiempo, el período vital medio del último 10% superviviente se incrementaba en un 10,01% ($p < 0,005$) y el máximo aumentaba en 3 meses (+ 9,8%). La fenformina atenuaba el desarrollo de tumores espontáneos en comparación con el grupo de control. El tratamiento de ratas con otro antidiabético de la familia de las biguanidas, la buformina, aumentaba ligeramente su período vital medio (7,3%; $p < 0,05$) y también el máximo en 2 meses (+ 5,5%), en comparación con los grupos de control. El índice de envejecimiento de la población de roedores descendió en un 18,1% ($p < 0,05$) y el MRDT aumentó 1,22 veces bajo la influencia de la buformina ($p < 0,05$). Por último, la incidencia total de tumores descendió en un 49,5% en ratas tratadas con buformina. Ambos antidiabéticos disminuían ligeramente el peso corporal y reducían el declive asociado a la edad de la función reproductora en ratas hembras. Los resultados de nuestros experimentos aportan pruebas prometedoras del efecto geroprotector de los antidiabéticos de la familia de las biguanidas, además de ser fármacos que se pueden utilizar para prevenir el cáncer.

Es interesante resaltar que otro antidiabético biguanídico, la metformina, puede mejorar la regularidad menstrual, favorecer la ovulación espontánea y potenciar la inducción de la ovulación por citrato de clomifeno en mujeres con el síndrome de ovarios poliquísticos⁴¹. El tratamiento con fenformina también reduce el umbral de sensibilidad hipotalámica a la regulación con glucocorticoides y estímulos metabólicos (glucosa e insulina)²⁹. Recientemente se ha demostrado que los elementos implicados en las vías de señalización de insulina/IGF-1 son regulados a nivel funcional y/o de expresión en el sistema nervioso central; esta regulación puede desempeñar un papel en la resistencia del cerebro a la insulina⁴², en el control del desarrollo folicular de los ovarios y la ovulación⁴³, y en el control cerebral del período vital^{44,45}. Las biguanidas también pueden mejorar la inmunodepresión asociada a la edad²⁹. Estos mecanismos se pueden incluir en el efecto geroprotector de las biguanidas.

El efecto anticancerígeno de los antidiabéticos biguanidas se ha demostrado en relación con la carcinogénesis espontánea en ratones y ratas, en distintos modelos de carcinogénesis química en ratones, ratas y hámsters, y en el modelo de carcinogénesis por radiación en ratas⁴⁶.

El estudio comparativo de 10 años sobre los resultados de la rehabilitación metabólica en pacientes con cáncer (incluyendo la dieta restringida en grasas e hidratos de carbono y el tratamiento con biguanidas) ha mostrado un aumento significativo de supervivencia en pacientes con cáncer de mama y de colon, la prolongación del período libre de cáncer y una disminución en la incidencia de metástasis, en comparación con el grupo de pacientes control³⁸. También se ha demostrado que la administración de antidiabéticos biguanidas en pacientes con hiperlipidemia reduce el nivel de colesterol en sangre, triglicéridos y β -proteínas; asimismo, también inhibe el desarrollo de la aterosclerosis, reduce el hiperinsulinismo en varones con enfermedades arteriales coronarias, aumenta la sensibilidad hipotálamo-pituitaria a la inhibición por dexametasona y estrógenos, restaura el ciclo del celo en ratas viejas con celo persistente, mejora la inmunidad celular en pacientes con cáncer y aterosclerosis, y reduce los valores de IGF-1 en sangre en pacientes con cáncer y aterosclerosis con hiperlipoproteinemia de tipo IIb²⁹. Recientemente se ha demostrado que la metformina disminuye la producción de aniones de superóxido en plaquetas de pacientes diabéticos⁴⁷.

SENECENCIA CELULAR Y CÁNCER(1)

En contraste con las células germinales y ciertas células madre, la mayor parte de los tipos de células somáticas

(1) Se entiende como senescente la célula que, al final de su vida proliferativa, llega a una fase de pérdida absoluta e irreversible para dividirse. En esta situación, la célula puede vivir un período en el cultivo habitualmente corto, hasta producirse la muerte.

cas tienen un ciclo de proliferación limitado. Estos límites pueden haber evolucionado como un mecanismo de defensa contra el cáncer, aunque también pueden ocasionar una acumulación de células al término de su ciclo de replicación que podría ser la causa del proceso de envejecimiento y aumentar la propensión al cáncer⁴⁸. Las células somáticas de algunas especies (p. ej., los peces) poseen un fenotipo inmortal, pero estos organismos no desarrollan más cánceres que otras especies⁴⁹. La capacidad de transformación varía durante las distintas etapas del declive proliferativo, según el agente cancerígeno; así, las células jóvenes son más susceptibles de transformación por agentes cancerígenos químicos y por bajas dosis de radiación ionizante, la susceptibilidad a la radiación ultravioleta es idéntica durante el ciclo vital de fibroblastos humanos, mientras que la susceptibilidad a un promotor tumoral es idéntica en todas las células. Con excepción de la última fase de vida celular, la susceptibilidad al SV40 alcanza el valor más alto durante el pase final^{49,50}. Otros estudios demostraron que los fibroblastos embrionarios de rata eran mucho más susceptibles a la transformación *v-scr* que cuando eran aislados a partir de una rata adulta⁵¹. Al estudiar el papel de la evolución de organismos y del envejecimiento en la transformación oncogénica de células primarias, se observó que el envejecimiento tisular del donante se asociaba con la mayor susceptibilidad del cultivo primario a la transformación SV-LT⁵². La inducción de senescencia celular como respuesta a un potente oncogénico, como el *ras*, indica que dicha senescencia es una reacción celular programada que puede dispararse no sólo por duplicación acumulativa de células, sino también por ciertas alteraciones en la proliferación⁵³.

En los últimos años se ha subrayado la importancia de los telómeros en el envejecimiento. Los telómeros son secuencias de ADN que se encuentran al final de los cromosomas eucarióticos en las células somáticas. Durante la replicación de la célula, los telómeros son protegidos por la enzima telomerasa, una enzima ribonucleoproteíntica que añade la secuencia de telómeros TTAGGG al final del cromosoma^{48,54,55}. En ausencia de telomerasa, los telómeros se van acortando en cada división celular. La pérdida de región distal de los telómeros se correlaciona con el declive del ciclo proliferativo de las células, tanto *in vitro* como *in vivo*^{54,55}.

Existen serios argumentos que sugieren que el acortamiento de telómeros y la reactivación de la telomerasa constituyen factores importantes del envejecimiento y la aparición de cánceres, respectivamente^{48,56}. Se ha sugerido que la función más importante del tipo salvaje p53 puede ser la detención del crecimiento celular como respuesta a la pérdida de telómeros en las células senescentes⁵⁷. Esta hipótesis concuerda con el comportamiento de la mayoría de los tumores que presentan la mutación del p53, y explicaría también la existencia y las características de tipos raros de tumor en los que la función del p53 parece estar retenida.

Krtolica et al⁵⁸ han demostrado recientemente que los fibroblastos humanos senescentes estimulan la proliferación en el cultivo de células epiteliales premalignas y malignas (pero no normales) y la formación de tumores en ratones *nude*. Es importante añadir que el efecto de fibroblastos presenescientes era menor que el de los senescentes. También se observó que células jóvenes (de pasos iniciales, habiendo vivido menos del 30% de su ciclo proliferativo) de la estroma endometrial de adultos humanos inhibían el rasgo de malignidad asociado al anclaje de proliferación independiente de células epiteliales cancerosas de endometrio, mientras que las células de estroma envejecidas (habiendo vivido un 90% de su ciclo de replicación) perdían *in vitro* esta capacidad⁵⁹.

Es interesante resaltar que la senescencia celular no es una consecuencia inevitable de la extensa proliferación en el cultivo. Así, las células Schwann de rata parecen tener la capacidad de una ilimitada proliferación *in vitro*, mientras que los fibroblastos aislados a partir de los mismos nervios sufren la clásica senescencia de replicación observada en los fibroblastos de roedores⁶⁰. Algunas otras células precursoras de roedores normales (p. ej., los oligodendrocitos) tienen una capacidad de proliferación ilimitada si se cultivan en condiciones que evitan la diferenciación y la activación del control que delimita el ciclo proliferativo⁶¹. Al contrario que en el caso de los fibroblastos, las células epiteliales mamarias humanas se escapan de la senescencia de forma espontánea y generan anomalías genómicas que se requieren para la iniciación de la carcinogénesis⁶². En este estudio, sobre la evolución de 75 *doublings* (duplicaciones de la población celular), se registraron datos de proliferación, supervivencia, cariotipo, longitud de telómero y valores de proteínas p53, su modulador p14 y efector p21. Las células supervivientes del proceso de selección parecían haber perdido la expresión p16, un hecho que se correlaciona con su liberación del freno de crecimiento. Entonces, durante la segunda fase de crecimiento exponencial, las células empezaron a acumular anomalías cromosómicas; la observación de que las células epiteliales mamarias sufren un progresivo acortamiento de telómeros es coherente con estos resultados. Al mismo tiempo, se elevaron los valores de proteínas p53, de su modulador (p14) y ejecutor (p21), lo que sugería que las células mamarias *in vitro* agonizantes (así llamadas para distinguirlas de las senescentes causantes del *plateau* en la curva de crecimiento observado en fibroblastos), efectivamente eludían la regulación por el p53. Estos estudios sugieren que el envejecimiento del epitelio mamario es capaz de generar espontáneamente las anomalías genómicas necesarias para la aparición de una célula cancerosa⁶³. Aunque la actividad de la telomerasa está elevada en carcinomas ductales de mama y en sus precursores inmediatos, todavía no hay pruebas de acortamiento de telómeros en tejidos mamarios normales y malignos⁶⁴. Parece que en algunas células epiteliales no se presenta la senescencia.

Una cuestión fundamental relativa al modelo carcinogénico integrado concierne a los cambios asociados a la edad en el microentorno de los tejidos, dado que dichos cambios pueden favorecer o dificultar la aparición del cáncer en distintas circunstancias. Si el envejecimiento de los tejidos altera el entorno donde se va a desarrollar el tumor, debería haber una relación entre el índice de crecimiento de tumores transferibles con la edad del tejido receptor⁶. Estos experimentos eluden el efecto de la edad en el propio cáncer y exploran la función de los cambios en el organismo debidos a la edad sobre el crecimiento y evolución de las células transformadas. Los datos disponibles, tanto en animales de experimentación como en humanos, son contradictorios y sostienen distintos efectos de la edad en el desarrollo de tumores⁶. En general, se puede aceptar este «efecto de edad» en el crecimiento de tumores malignos, tanto en animales de experimentación como en humanos.

El origen del tejido (histogénesis) y la inmunogenética del tumor son los factores principales que determinan diferencias asociadas a la edad en el crecimiento del tumor. No obstante, es cada vez más evidente que los cambios en el microentorno del tumor asociados a la edad también pueden desempeñar un papel significativo. En nuestros experimentos se inoculaban por vía intravenosa a ratas de diversas edades células del rhabdomicosarcoma RA-2 de rata, seleccionadas por afinidad al tejido pulmonar⁶⁵; se encontró una correlación positiva entre el número de colonias de tumor pulmonar y la actividad de somatomedina (IGF-I) en el pulmón. Es decir, los resultados sugieren un papel importante del microentorno receptor y donante en la posible formación de colonias de células RA-2 en el pulmón.

McCullough et al⁶⁶ observaron que las líneas celulares transformadas de hígado de rata sólo presentaban un ligero efecto carcinogénico cuando eran trasplantadas en el hígado de ratas jóvenes. La producción de tumores de estas líneas celulares se incrementaba progresivamente con la edad del receptor. Estos resultados inducen a pensar que el microentorno del tejido es un determinante fundamental en el potencial de producción de tumores por células transformadas.

Es importante recalcar que, en cada tejido, el número de acontecimientos que ocurren en la célula madre antes de llegar a su completa transformación es variable y depende de muchos factores, en especial del grado de envejecimiento del tejido diana y de su(s) sistema(s) regulador(es)^{4,6}.

La glándula pineal, envejecimiento y cáncer

Entre los candidatos más promocionados para obtener el título de «geroprotector», lo que significa «proteger contra el envejecimiento», uno de los primeros es la melatonina. La cantidad de trabajos clasificados en MEDLINE bajo el epígrafe «melatonina» se acerca a los 10.000,

y con las palabras «melatonina y envejecimiento» pasa de los 500. ¿Qué sabemos realmente sobre los efectos de esta hormona sobre el potencial vital y los procesos asociados a la edad, incluyendo las enfermedades?

La melatonina (N-acetyl-5-metoxy-triptamina) es la principal hormona pineal sintetizada del triptófano, sobre todo durante la noche⁶⁷. La melatonina es crucial para la regulación de los cambios circadianos y estacionales en diversos aspectos de la función fisiológica y neuroendocrina⁶⁸. A medida que la edad avanza, desciende la producción nocturna de melatonina en varias especies de animales, incluyendo a los humanos⁶⁹. La extirpación pineal en ratones ocasiona la reducción de su período vital^{70,71}, mientras que el injerto de la glándula pineal de un donante joven en el timo de ratones viejos singénicos, o *in situ* en ratones viejos con extirpación previa de la glándula pineal, alarga la vida del receptor^{72,73}.

Nosotros hemos realizado una revisión crítica de los resultados de algunos estudios sobre los efectos de la melatonina pineal en el período vital de ratones, ratas, moscas de la fruta y gusanos⁷⁴. En ratones, la administración de melatonina a largo plazo alargaba la vida en 12 experimentos, pero no tuvo ningún efecto en 8 de los 20 experimentos revisados. En experimentos diseñados adecuadamente (50 animales por grupo), la melatonina administrada durante la noche a dosis relativamente bajas (2,5-3 mg/kg de peso) retrasaba la disminución del celo por la edad e incrementaba la supervivencia de los animales. En *D. melanogaster*, el suplemento de melatonina en el medio nutritivo durante las fases de desarrollo daba resultados contradictorios, pero cuando la melatonina se añadía al alimento durante el ciclo vital, se observaba un incremento en la duración de la vida de las moscas de la fruta. Por otro lado, la melatonina reducía la supervivencia del *C. elegans*, pero incrementaba el ciclo vital clínico del gusano *Planaria* (*Paramecium tertiaurelia*). Los datos disponibles sugieren efectos antioxidantes y aterogénicos de la melatonina. La melatonina sola no resulta tóxica ni mutágena en el test de Ames, pero en el ensayo COMET revela rotura cromosomal en altas concentraciones. En ratones y ratas, la melatonina inhibe las mutaciones inducidas por radiación y por agentes mutantes químicos indirectos, e inhibe la carcinogénesis espontánea o inducida químicamente. Así, se dispone de datos sobre el efecto supresor de la melatonina en la carcinogénesis espontánea e inducida por agentes químicos, así como en el desarrollo de tumores de mama por radiación ionizante en ratones y ratas⁷⁵, de adenocarcinomas de endometrio espontáneos en ratas BDII/Han⁷⁶, del cáncer de colon inducido por 1,2-dimetilhidracina en ratas⁷⁷, del cáncer inducido por DMBA del cuello uterino y vagina en ratones⁷⁸, y de lesiones preneoplásicas de hígado inducidas por N-nitrosodiotilamina en ratas⁷⁹. Finalmente, se ha observado un efecto beneficioso de la melatonina en el tratamiento de pacientes con cáncer avanzado⁸⁰.

Los resultados de la administración de melatonina a mujeres premenopáusicas son prometedores⁸¹, pero hay datos indudables sobre efectos adversos de la melatonina recogidos en 2001 por la US General Account Office⁸² que resumimos a continuación: la melatonina puede causar infertilidad, hipotermia y daños en la retina; disminuye la libido en el macho; induce la hipertensión, diabetes y cáncer; además, puede causar o intensificar la depresión en individuos propensos a ella. También se ha informado que la melatonina puede ser peligrosa para las personas que presenten algún factor de riesgo cardiovascular; tampoco debe administrarse a personas con alteraciones del sistema inmunológico (incluyendo alergias graves), enfermedades autoinmunes (como la artritis reumatoide), tumores malignos del sistema inmunológico (p. ej., linfoma), enfermedad mental severa, o a personas que tomen esteroides. Por tanto, creemos que son necesarios más ensayos clínicos y estudios más profundos para evaluar tanto la eficacia como los riesgos de la aplicación de melatonina en humanos.

CONCLUSIÓN

El análisis de la evolución de las teorías sobre el envejecimiento pone de manifiesto que cualquier «punto conflictivo» nuevo en Gerontología crea un nuevo misterio. Hoy día, los temas que acaparan el mayor interés son: el papel que desempeñan las vías de señalización de la insulina y del estrés oxidativo en la longevidad; el papel de la senescencia celular, telómeros y telomerasa en el envejecimiento y el cáncer; el papel de la glándula pineal en el envejecimiento y la búsqueda de fármacos que prolonguen la vida. En *C. elegans*, *D. melanogaster*, ratones y humanos, las mutaciones en los genes que actúan en la transducción de la señal del receptor de insulina al factor de transcripción *daf-16* o su homólogo se relacionan sólidamente con la longevidad. Una revisión crítica de los datos disponibles sobre el efecto de los fármacos que prolongan la vida ha puesto de manifiesto que la mayoría de los estudios no son válidos desde el punto de vista de las actuales directrices en cuanto a la aplicación continuada de productos químicos para la prevención del cáncer y, hasta cierto punto, desde el punto de vista de la habitual corrección del experimento gerontológico⁸³. Creemos que se debería establecer un programa internacional para poder evaluar competentemente el efecto de las intervenciones en humanos con el propósito de prolongar la vida; un programa, como el que dirige la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, para la evaluación del riesgo cancerígeno y la acción de productos químicos para prevenir el cáncer. El objetivo de este programa sería la valoración de diversos tipos de medidas (químicas, inmunológicas, de nutrición y de comportamiento) encaminadas a prolongar la vida o a evitar el envejecimiento prematuro. El mencionado objetivo del programa —a revisión crítica y evaluación de las pruebas que pretenden evidenciar la prolongación de la vida— estaría relacionado con una amplia gama de

posibles geroprotectores y medidas aplicadas por grupos de expertos de colaboración internacional. El programa puede ayudar a autoridades nacionales e internacionales en la elaboración de planes de promoción de la salud y prevención del envejecimiento prematuro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Finch CE, Ruvkun G. The genetics of aging. *Ann Rev Genomics Hum Genet* 2001;2:435-62.
2. Butler RN, Fossel M, Harman SM, et al. Is there an antiaging medicine? *J Gerontol Biol Sci* 2002;57A:B333-8.
3. Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, et al. Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science* 2003;299:1355-9.
4. Anisimov VN. Aging and cancer in transgenic and mutant mice. *Front Biosci* 2003;8:S883-902.
5. Liang H, Masoro EJ, Nelson JF, et al. Genetic mouse models of extended lifespan. *Exp Gerontol* 2003;38:1353-64.
6. Anisimov VN. Carcinogenesis and aging. Vols 1 and 2. Boca Raton: CRC Press, 1987.
7. Anisimov VN. The relationship between aging and carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;45:277-304.
8. Ames BN, Shigenaga MB, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7915-22.
9. Harman D. Extending functional life span. *Exp Gerontol* 1998;33:95-112.
10. Skulachev VP. The programmed death phenomena, aging, and the Samurai law of biology. *Exp Gerontol* 2001;36:995-1024.
11. Cutler R. Oxidative stress: its potential relevance to human disease and longevity determinants. *Age* 1995;18:91-6.
12. Arking R, Force AG, Dugas SP, et al. Factors contributing to the plasticity of the extended longevity phenotypes of *Drosophila*. *Exp Gerontol* 1996;31:623-43.
13. Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994;263:1128-30.
14. Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, et al. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nature Genetics* 1998;19:171-4.
15. Melov S, Ravenscroft J, Malik S, et al. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 2000;289:1567-9.
16. Huang TT, Carlson EJ, Gillespie AM, et al. Ubiquitous overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000;55:B5-9.
17. Babich H. Butylated hydroxytoluene (BHT): a review. *Environ Res* 1982;29:1-29.
18. Ito N, Hirose M. The role of antioxidants in chemical carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 1987;78:1011-26.
19. Manson MM, Green JA, Driver HE. Ethoxyquin alone induces preneoplastic changes in rat kidney whilst preventing induction of such lesions in liver by aflatoxin B(1). *Carcinogenesis* 1987;8:723-8.
20. Porta EA, Joun NS, Nitta RT. Effect of the type of dietary fat at two levels of vitamin E in Wistar male rats during development and aging. I. Life span, serum biochemical parameters and pathological changes. *Mech Ageing Dev* 1980;13:1-39.
21. Toth B, Patil K. Enhancing effect of vitamin E on murine intestinal tumorigenesis by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *J Natl Cancer Inst* 1983;70:1107-11.
22. Ohshima M, Ward JM, Wenk ML. Preventive and enhancing effects of retinoids on the development of naturally occurring tumors of skin, prostate gland, and endocrine pancreas in aged male ACI/segHapBR rats. *J Natl Cancer Inst* 1985;74:517-24.
23. Schroeder HA, Mitchener M. Selenium and tellurium in rats: effect on growth, survival and tumors. *J Nutr* 1971;101:1531-40.
24. Cherkes LA, Aptekar SG, Volgarev MN. Liver tumors induced by selenium. *Bull Exp Biol Med* 1962;53:78-83.
25. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biol Med* 1999;26:1034-53.

26. Bartke A, Chandrashekhar V, Dominici F, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF01) and aging: controversies and new insights. *Biogerontology* 2003;4:1-8.
27. Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 2003;299:1346-51.
28. Facchini FS, Hua NW, Reaven GM, Stoohs RA. Hyperinsulinemia: the missing link among oxidative stress and age-related diseases? *Free Radicals Biol Med* 2000;29:1302-6.
29. Dilman VM. Development, aging and disease. A new rationale for an intervention. Harwood Academic Publ, Chur, 1994.
30. Barbieri M, Rizzo MR, Manzella D, et al. Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians. *Exp Gerontol* 2003;38:137-43.
31. Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH. Colorectal cancer mortality and factors related to the insulin resistance syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:385-91.
32. Gupta K, Krishnaswamy G, Karnad A, Peiris AN. Insulin: a novel factor in carcinogenesis. *Am J Med Sci* 2002;323:140-5.
33. Longo VD, Finch CE. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* 2003;299:1342-6.
34. Masoro EJ. Subfield history: caloric restriction, slowing aging, and extending life. *Science's SAGE KE*, 2003, ns2 [consultado 26/7/2003]. Disponible en: <http://Sageke.sciencemag.org/cgi/content/full/sageke/2003/8/re2>.
35. Hadley EC, Dutta C, Finkelstein J, et al. Human implications of caloric restriction's effect on laboratory animals: an overview of opportunities for research. *J Gerontol Ser A* 2001;56A(Special Issue 1):5-6.
36. Weindruch R, Keenan KP, Carney JM, et al. Caloric restriction mimetics: metabolic intervention. *J Gerontol Biol Sci* 2001;56A(Special Issue 1):20-33.
37. Muntoni S. Metformin and fatty acids. *Diabetes Care* 1999;22:179-80.
38. Bernstein LM, Evtushenko TP, Tsyrlyna EV, et al. Comparative study of 5- and 10-year-long results of the metabolic rehabilitation of cancer patients. En: Hanson KP, Dilman VM, editors. *Neuroendocrine system, metabolism, immunity and cancer (clinical aspects)*. St. Petersburg: NN Petrov Research Institute of Oncology Publ, 1992; p. 102-12.
39. Bakaev VV. Effect of 1-butylbiguanide hydrochloride on the longevity in the nematoda *Caenorhabditis elegans*. *Biogerontology* 2002;3(Suppl 1):23-4.
40. Anisimov VN, Semenchenko AV, Yashin AI. Insulin and longevity: antidiabetic biguanides as geroprotectors. *Biogerontology* 2003;4:297-307.
41. Awartani KA, Cheung AP. Metformin and polycystic ovary syndrome: a literature review. *J Obstet Gynecol Can* 2002;24:393-401.
42. Fernandes ML, Saad MJ, Velloso LA. Effect of age on elements of insulin-signaling pathway in central nervous system of rats. *Endocrine* 2001;16:227-34.
43. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:195-220.
44. Chiba T, Yamaza H, Higami Y, Shimokawa I. Anti-aging effects of caloric restriction: Involvement of neuroendocrine adaptation by peripheral signaling. *Microsc Res Tech* 2002;59:317-24.
45. Mattson MP, Duan W, Maswood N. How does the brain control lifespan? *Ageing Res Rev* 2002;1:155-65.
46. Anisimov VN. Insulin: IGF-1 signaling pathway driving aging and cancer as a target for pharmacological intervention. *Exp Gerontol* 2003;38:1041-9.
47. Gargiulo P, Caccese D, Pignatelli P, et al. Metformin decreases platelet superoxide anion production in diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev* 2002;18:156-9.
48. Campisi J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol* 2003;38:5-11.
49. Maciera-Coelho A. Neoplastic disease through the human life span. *Biogerontology* 2001;2:179-92.
50. Maciera-Coelho A. Genome reorganization through cell division, implications for aging of the organism and cancer development. *Ann NY Acad Sci* 1994;719:108-28.
51. Tavoloni N, Inoue H. Cellular aging is a critical determinant of primary cell resistance to v-src transformation. *J Virol* 1997;71:237-47.
52. Kunisada T, Danner D, Friedman V, Schneider EL. Increased susceptibility to SV40 transformation with development and in vitro aging. *Exp Cell Res* 1990;189:222-6.
53. Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 2000;35:317-29.
54. Shay JW, Wright WE, Werbin H. Loss of telomeric DNA during aging may predispose cells to cancer. *Int J Oncology* 1993;3:559-63.
55. Reddel RR. A reassessment of the telomere hypothesis of senescence. *Bioessays* 1998;20:977-84.
56. Blagosklonny MV. How carcinogens (or telomere dysfunction) induce genetic instability: associated-selection model. *FEBS Lett* 2001;506:169-72.
57. Wynford-Thomas D, Bond JA, Wyllie FS, Jones CJ. Does telomere shortening drive selection for p53 mutation in human cancer? *Mol Carcinogenesis* 1995;12:119-23.
58. Krtolica A, Parinello S, Locckett S, et al. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12072-7.
59. Rinehart CA, Torti VR. Aging and cancer: the role of stromal interactions with epithelial cells. *Mol Carcinogenesis* 1997;18:187-92.
60. Mathon NF, Malcolm DS, Harris singh MC, et al. Lack of replicative senescence in normal rodent glia. *Science* 2001;291:872-5.
61. Tang DG, Tokumoto YM, Apperly JA, et al. Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cell. *Science* 2001;291:868-71.
62. Romanov SR, Kozakiewicz BK, Holst CR, et al. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* 2001;409:633-7.
63. Clevenger CV. A old epithelial cell never dies, it just agoneses away. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:183-4.
64. Rha SY. Changes of telomerase and telomere length in paired normal and cancer tissues of breast. *Int J Oncol* 1999;15:839-45.
65. Anisimov VN, Zhukovskaya NV, Loktionov AS, et al. Influence of host age on lung colony forming capacity of injected rat rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Lett* 1988;40:77-82.
66. McCullough KD, Coleman WB, Smith GJ, Grisham JW. Age-dependent regulation of the tumorigenic potential of neoplastically transformed rat liver epithelial cells by the liver microenvironment. *Cancer Res* 1994;54:3668-71.
67. Arendt J. Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. London: Chapman & Hall, 1995.
68. Pevet P, Bothorel B, Slotten H, Sabouret M. The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res* 2002;309:183-91.
69. Touitou Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp Gerontol* 2001;36:1083-100.
70. Malm OJ, Skaug OE, Lingjaerde P. The effect of pinealectomy on bodily growth. *Acta Endocrinol* 1959;30:22-8.
71. Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, et al. Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rats. *Mech Ageing Dev* 1999;110:157-73.
72. Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:787-91.
73. Lesnikov VA, Pierpaoli W. Pineal cross-transplantation (old-to-young and vice versa) as evidence for an endogenous «aging clock». *Ann NY Acad Sci* 1994;719:461-73.
74. Anisimov VN. Effects of exogenous melatonin: a review. *Toxicol Pathol* 2003b;31:589-603.
75. Cos S, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin and mammary pathological growth. *Front Neuroendocrin* 2000;17:133-70.
76. Deerberg F, Bartsch C, Pohlmeier G, Bartsch H. Effect of melatonin and physiological epiphysectomy on the development of spontaneous endometrial carcinoma in BDII/HAN rats. *Cancer Biother Radiopharmacol* 1997;12:420.
77. Anisimov VN, Popovich IG, Zabzhinski MA. Melatonin and colon carcinogenesis: I. Inhibitory effects of melatonin on development of intestinal tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Carcinogenesis* 1997;18:1549-53.
78. Anisimov VN, Zabzhinski MA, Popovich IG, et al. Inhibitory effect of melatonin on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis of the uterine cervix and vagina in mice and mutagenesis in vitro. *Cancer Lett* 2000;156:199-205.
79. Imaida K, Hagiwara A, Yoshino H, et al. Inhibitory effects of low doses of melatonin on induction of preneoplastic liver lesions in a medium-term liver bioassay in F344 rats: relation to the influence of electromagnetic near field exposure. *Cancer Lett* 2000;155:105-14.
80. Lissoni P. Is there a role for melatonin in supportive care? *Support Care Cancer* 2002;10:110-6.

81. Bellipanni G, Bianchi P, Pierpaoli W, et al. Effects of melatonin in perimenopausal and menopausal women: a randomized and placebo controlled study. *Exp Gerontol* 2001;36:297-310.
82. US General Accounting Office. Anti-aging products pose potential for physical and economic harm. Special Committee on Aging, GAO-01-1129, September 2001. Disponible en: <http://aging.senate.gov/hr73gao.pdf>
83. Anisimov VN. Life span extension and cancer risk: myths and reality. *Exp Gerontol* 2001;36:1101-36.
84. Chen JB, Sun J, Jazwinski SM. Prolongation of the yeast life span by the v-Ha-RAS oncogene. *Mol Microbiol* 1990;4:2081-6.
85. Lin YJ, Seroude L, Benzer S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science* 1998;282:943-6.
86. Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1996;382:536-9.
87. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997;277:942-6.
88. Mitsui A, Hamuro J, Nakamura R, et al. Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:693-6.
89. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, et al. The p66^{sh} adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 1999;402:309-13.
90. Holzenberger M, Dupond J, Ducos B, et al. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 2003;421:182-7.
91. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells. *Sciences* 1998;279:349-52.