

Integración de teorías del envejecimiento (parte I)

J. Miquel

Departamento de Biotecnología. Universidad de Alicante. Alicante. España.

RESUMEN

Las teorías del envejecimiento ofrecen explicaciones de las causas y efectos de este proceso, que es similar en los distintos niveles de organización biológica (tisular, celular y molecular) tanto en el hombre como en cualquier otro animal multicelular. Dada la gran complejidad de los cambios que tienen lugar en el envejecimiento, no puede sorprender que se hayan propuesto numerosas teorías para explicar el *dónde*, el *cómo* y el *porqué* de estos cambios entre los que destacan los siguientes: descenso progresivo de los valores máximos de rendimiento fisiológico, disminución del número de células que se encuentran en los epitelios germinales y cambios atróficos o apoptosis de las células diferenciadas, acompañados en el ámbito subcelular por un descenso del número de ribosomas y mitocondrias y una acumulación del pigmento del envejecimiento, la lipofuscina.

Algunas de entre las «más de 300 teorías del envejecimiento» mencionadas por Medvedev en su revisión de 1990 han sido abandonadas, al no poder ratificarse con los datos obtenidos en las investigaciones en sujetos humanos y animales de laboratorio, mientras que otras teorías encuentran apoyo experimental. Entre estas últimas destacan la teoría de Pearl, que liga el proceso de envejecimiento al «desgaste» o desorganización (que sería un «efecto secundario» del metabolismo), así como el concepto de Minot, que define dicho proceso como «el precio que pagan los metazoos por la diferenciación celular».

Por el contrario, la teoría del *error catastrófico en la síntesis de proteínas* (de Orgel), que gozó de gran aceptación, no ha podido ser confirmada por la investigación experimental, y se cuestiona la relevancia de la popular teoría del *límite mitótico* de Hayflick (basada en el agotamiento de la capacidad de división celular *in vitro*) para explicar el envejecimiento de los organismos multicelulares. En la actualidad, se acepta generalmente que el envejecimiento está ligado a la desorganización celular por el *estrés oxidativo causado por los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno* (ROS), de acuerdo con las teorías publicadas independientemente por Harman y Gerschman, así como el papel clave del genoma de las mitocondrias de las células diferenciadas como principal diana de las ROS, según la *teoría del estrés oxidativo/lesión mitocondrial* propuesta por el autor de esta revisión.

Correspondencia: Dr. J. Miquel.
Departamento de Biotecnología. Universidad de Alicante.
Marqués de Campo, 66. 03700 Denia. Alicante. España.
Correo electrónico: kiri_miquel@yahoo.com

Recibido el 22-06-05; aceptado el 4-07-05.

Palabras clave

Teorías. Teoría mitocondrial. ROS. Radicales libres. Estrés oxidativo. Genes del envejecimiento.

Integration of theories of ageing

ABSTRACT

Theories of ageing offer explanations of the causes and effects of the ageing process, which is similar at the distinct levels of biological organization (physiological, cellular and molecular) both in humans and in multicellular animals. Given the enormous complexity of the changes associated with ageing, it is not surprising that many theories have been proposed to explain the *where*, *how* and *why* of these changes. Notable among these changes are the progressive decrease in the levels of maximal physiological competence and the number of epithelial germ cells, as well as atrophic changes or apoptosis of the differentiated cells, accompanied at the subcellular level by a decrease in the number of ribosomes and mitochondria and accumulation of the age pigment *lipofuscin*.

Some of the «more than 300 theories of aging» mentioned by Medvedev in his review published in 1990 have been abandoned since they have not been confirmed by data from research in humans and laboratory animals, whereas other theories have been supported by experimental studies. Notable among these are Pearl's theory, which links the ageing process to «wear- and- tear» or disorganization (which can be considered «a side effect» of metabolism), and the concept of Minot, who defined senescence as the «price paid by metazoans for the differentiation process shown by their cells».

In contrast, the theory of the *catastrophic error in protein synthesis* proposed by Orgel, which gained wide acceptance, was not confirmed by experimental research. Doubts have also been raised about the relevance of Hayflick's popular theory of the *mitotic limit* (based on the exhaustion of the mitotic division potential *in vitro*) to explain the senescent process of multicellular organisms.

Currently, the cellular disorganization of ageing is generally accepted to be linked to the *oxidative stress caused by free radicals and other reactive oxygen species* (ROS), in agreement with the theories published independently by Harman and Gerschman. Also widely accepted is the key role of the mitochondrial genes of differentiated cells as the main target of ROS attack, according to the *oxygen stress/mitochondrial damage theory* proposed by the present author.

Key words

Theories. Mitochondrial theory. ROS. Free radicals. Oxidative stress. Genes of aging.

TABLA 1. Las más importantes teorías «clásicas» del envejecimiento

Autor	Año de publicación	Concepto clave/causa del envejecimiento	Referencia
Weissman	1891	División del trabajo entre células germinales (<i>inmortales</i>) y somáticas (<i>destinadas a envejecer</i>)	34
Minot	1907	«Precio pagado por la diferenciación celular»	43
Pearl	1928	El envejecimiento es un «efecto secundario» del metabolismo	35
Harman	1956	Lesiones causadas por los radicales libres (de oxígeno)	64
Williams	1957	Efecto de genes beneficiosos para el vigor máximo en la edad reproductora y nocivos posteriormente	14
Gerschman	1962	Efecto de la toxicidad del oxígeno, por insuficiencia de las defensas antioxidantes	66

INTRODUCCIÓN

Las teorías¹⁻⁴ sobre las 2 cuestiones clave del proceso de envejecimiento, que son: a) las causas de este proceso, desde los puntos de vista molecular y de la evolución biológica, y b) los mecanismos que fijan un límite a la duración de la vida de los animales y de los sujetos humanos, surgen con el progreso de las ciencias experimentales que tuvo lugar en el siglo XIX. Estas teorías gerontológicas ofrecen explicaciones parciales de los mecanismos del envejecimiento, y en cada época se centran en los aspectos de este proceso relacionados con los avances contemporáneos de la biología y de la medicina. Y, así, la actual investigación gerontológica incluye desde el análisis de las curvas de supervivencia de las poblaciones y la pérdida de rendimiento de los sistemas fisiológicos hasta un creciente interés en los mecanismos del control genético del envejecimiento y su relación con la longevidad.

En su revisión de 1990, afirma Medvedev⁵: «Hay más de 300 teorías del envejecimiento y el número sigue aumentando. Esto es la consecuencia natural del progreso muy rápido de nuestra comprensión de los fenómenos biológicos y de la aplicación a la investigación gerontológica de muchos enfoques y métodos nuevos. Casi cada descubrimiento importante en biología celular y molecular ha dado lugar a una nueva familia de teorías de envejecimiento, o nuevas versiones avanzadas de teorías más antiguas». También comenta que la tarea de revisar las teorías del envejecimiento se ha vuelto mucho más difícil y que un gran número de estas teorías son «muy selectivas» o están «anticuadas». Por otra parte, Vijn y Müller⁶ afirman que algunas antiguas hipótesis de los comienzos de la ciencia gerontológica hicieron posible la gran revolución científica en nuestra comprensión del envejecimiento que ahora presenciamos. Estamos de acuerdo con estas opiniones y con la conclusión de Medvedev⁵ de que la expectativa de que surja una teoría «verdaderamente unificada», o de «causa única» del envejecimiento no es realista. Y se acepta generalmente que aún no disponemos de todas las piezas del *puzzle* del envejecimiento. No obstante, sí que creemos posible ofrecer soluciones preliminares a dicho *puzzle*⁷⁻⁸ integrando varias teorías complementarias, clásicas (tabla 1) y modernas, que ofrecen explicaciones lógicas de los cambios que tienen lugar a los principales niveles de organización biológica.

Las teorías que revisamos, junto con una selección de datos que las apoyan (incluidos algunos de nuestro laboratorio obtenidos en *Drosophila* y ratón), se refieren al envejecimiento normal *in vivo* (caracterizado por la involución fisiológica) y no a las enfermedades asociadas al envejecimiento que pueden incluir uno o más síndromes degenerativos específicos.

DEFINICIÓN DEL ENVEJECIMIENTO NORMAL Y ESTUDIO DE SUS MECANISMOS DESDE EL PUNTO DE VISTA DEL «ANÁLISIS DE SISTEMAS»

Para definir el proceso de *envejecimiento normal* aún son relevantes los comentarios de Strehler⁹, de 1959, y sus observaciones posteriores¹⁰. Afirmaba este autor que los requisitos que debe tener un cambio ligado a la edad para ser considerado parte del *envejecimiento natural* (que consideremos equivalente a *normal*, *biológico* o *fisiológico*) son los siguientes: a) universalidad; b) naturaleza intrínseca; c) carácter progresivo, y d) efectos perjudiciales. Así, las alteraciones características del envejecimiento natural deben ocurrir en todos los individuos de una especie en lugar de en casos aislados que podrían sufrir las consecuencias de accidentes o genotipos anormales. Además, el carácter intrínseco de los cambios se considera necesario para distinguir el envejecimiento natural de otras alteraciones que pueden surgir con el paso del tiempo a causa de factores nocivos del medio ambiente. Y el carácter progresivo del envejecimiento está de acuerdo con el concepto de que se trata de un proceso y no de un fenómeno repentino.

De acuerdo en lo fundamental con Strehler, el presente autor define al envejecimiento normal de los metazoos como «un proceso de desorganización gradual e irreversible que ocurre con el paso del tiempo, causa una pérdida progresiva de la capacidad bioenergética y el rendimiento funcional e imposibilita la supervivencia ilimitada de los sujetos humanos y miembros de otras especies de metazoos, incluso en un hábitat óptimo».

Puesto que el envejecimiento se acompaña de una gran variedad de procesos fisiopatológicos, ya hemos comentado anteriormente¹ que conviene aplicar el método del

*análisis de sistemas*¹¹, que requiere, para revelar las relaciones causa/efecto en sistemas de gran complejidad, que los datos obtenidos en cada nivel de organización se contrasten con los datos obtenidos en los niveles superior e inferior. La aplicación de este método permite una prueba rigurosa de la validez de las teorías gerontológicas, pues los mecanismos que se proponen como causa del envejecimiento deben ser compatibles con las alteraciones que se encuentran en los metazoos viejos no sólo en el ámbito particularmente estudiado (tabla 2).

Teorías evolucionistas y genéticas

Según Strehler¹², esencialmente el proceso del envejecimiento se debe comprender en el caso de cada especie como un resultado de la evolución en un sentido positivo o negativo. Por el contrario, Medawar¹³ opina que la muerte por envejecimiento ocurre tan tarde en comparación con la muerte por causas accidentales (como falta de alimento o predación) en el hábitat natural de las especies, que retrasar el envejecimiento (o incluso el evitarlo totalmente) tendría una influencia mínima en la supervivencia de la especie. Y, según Williams¹⁴, el envejecimiento es el resultado de unos genes que programan el máximo vigor, especialmente para la reproducción, pero que desencadenan con el paso del tiempo la degeneración de las células y los órganos.

En cuanto al problema inverso, o sea los efectos del envejecimiento sobre los genes, dado el papel fundamental del genoma nuclear (nADN), es lógico suponer que las alteraciones que ocurren en las células que envejecen podrían derivar de una inestabilidad de la información molecular que reside en dicho genoma. La idea básica de esta teoría genética del envejecimiento es que una mutación del nADN debe alterar la fidelidad de la síntesis de proteínas, con la consiguiente involución funcional. Esta teoría del envejecimiento se ha abandonado al no cumplirse su predicción de que el envejecimiento se debe acelerar en relación directa con el número de mutaciones causadas por las radiaciones ionizantes o sustancias mutagénicas⁹⁻¹⁰.

Por otra parte, Orgel¹⁵ propuso, en 1963, que el envejecimiento podría derivar de errores en los mecanismos de transcripción del ARN que llevarían a la síntesis de proteínas anormales (*teoría del error catastrófico*). Este concepto está en desacuerdo con los datos experimentales, incluidos algunos de nuestro laboratorio¹⁶, que sugieren que si el envejecimiento efectivamente se iniciara en el genoma nuclear, la alteración genética sería cuantitativa («agotamiento») en lugar de cualitativa («mutación»), ya que no aparecen proteínas anormales en los tejidos al envejecer.

Control genético de la longevidad y efecto del envejecimiento sobre los genes

Según la revisión de Benard y Hekimi¹⁷, el hecho de que la máxima duración de la vida puede variar considerablemente entre las diversas especies apoya el concepto de que la longevidad tiene una base genética. Además, la selección de cepas de *Drosophila* y ratón de distinta longevidad muestra que incluso dentro de esta especie puede haber grandes diferencias, genéticamente controladas, en la duración de la vida.

Actualmente, se utilizan las técnicas del análisis genético para aclarar el papel del nADN en el envejecimiento y sus alteraciones con la edad, y según se deduce de un estudio sobre los perfiles de expresión de los genes en el músculo de ratones viejos, sólo un 1,8% de los genes investigados muestran cambios en su expresión durante el envejecimiento¹⁸. Una técnica complementaria a la del análisis genético^{18,19}, que está siendo objeto de numerosas publicaciones es la selección de mutantes longevos para facilitar la detección de «genes del envejecimiento». Esta técnica utiliza preferentemente al nematodo *C. elegans*, del que se han obtenido numerosos mutantes con una longevidad mayor que la normal^{17,20}. No obstante, aunque se acepta que la comprensión del efecto de los genes sobre el proceso de envejecimiento puede avanzar gracias a un análisis de mutantes longevos, la identificación de los mecanismos específicos del aumento de la longevidad es muy difícil a causa de la complejidad de las redes de regulación genética, con sus numerosas interacciones, y los miles de genes implicados en cada tipo celular.

En resumen, los datos revisados sugieren que casi todos los organismos que, a causa de las mutaciones genéticas, aumentan su longevidad con respecto a la longevidad normal de los miembros de su especie, muestran otros cambios fenotípicos que son marcadamente nocivos, o sea que «el aumento de la duración de la vida se hace a costa de una disminución del rendimiento funcional y menor capacidad de supervivencia de los animales en su hábitat natural»¹⁷.

Por otra parte, como ya hemos señalado, los genes no parecen controlar directamente el proceso de envejecimiento sino indirectamente a través de múltiples mecanismos protectores o destructores de la organización biológica inicial del organismo adulto²¹⁻²³.

Es obvio que el creciente uso de las técnicas genéticas permitirá avanzar en la comprensión de las causas del envejecimiento y de los factores que controlan la longevidad, aunque los logros conseguidos aún son escasos. Hasta ahora sólo se han descubierto unos pocos genes implicados en el envejecimiento, sobre todo en el nematodo *C. elegans* y el insecto *D. melanogaster*, y aún no se ha demostrado que los datos obtenidos en estos organismos sean relevantes para comprender mejor el envejecimiento humano²³.

Según los datos obtenidos en sujetos humanos²⁴, el envejecimiento se acompaña de una pérdida progresiva

Teorías fisiológicas

Según los datos obtenidos en sujetos humanos²⁴, el envejecimiento se acompaña de una pérdida progresiva

de rendimiento fisiológico y homeostasis y, por tanto, de una menor capacidad para responder a un estrés tanto interno como del medio ambiente, y de coordinación de las funciones del organismo. Esta pérdida de rendimiento funcional con el aumento de la edad también se ha observado en animales de experimentación, como es el caso de los ratones (en los que se aprecia un deterioro de los sistemas homeostáticos, es decir el neuroendocrino²⁵⁻²⁸ y el inmunitario^{29,30}) así como de *Drosophila* (cuyo envejecimiento se acompaña de un descenso de su geotaxis negativa y capacidad reproductora¹).

Dada la importancia que tienen los sistemas neuroendocrino e inmunitario en la regulación de todos los procesos fisiológicos^{11,12}, no puede sorprender que la involución de estos dos sistemas haya atraído la atención de los proponentes de mecanismos causantes del envejecimiento^{28,31}. Se atribuyó a las glándulas endocrinas y especialmente a las gónadas un papel clave en el envejecimiento, que justificaba los tratamientos «rejuvenecedores» de Brown-Sequard y Voronov, basados en la inyección de extractos de testículo y la implantación de estas glándulas, respectivamente³². También se han publicado numerosos trabajos sobre el envejecimiento del sistema neuroendocrino, al que se ha asignado un papel regulador del envejecimiento de *todo* el organismo. No obstante, según Hayflick³³: «Igual que la teoría inmunológica, la teoría endocrina carece de universalidad. En primer lugar, no todos los organismos que envejecen tienen complejos sistemas neuroendocrinos. En segundo lugar, el déficit que ocurre en el sistema neuroendocrino al envejecer puede ser el resultado de alteraciones básicas que ocurren, por ejemplo, en el genoma de todas las células viejas. Por ello, no existe una razón para dar al sistema neuroendocrino o a cualquier otro sistema el papel de coordinador de las alteraciones por el envejecimiento. Todos los sistemas de órganos envejecen y, probablemente, a diferente velocidad. Una vez más tenemos que distinguir entre causa y efecto».

Teorías del «desgaste»

Los conceptos relacionados con la teoría del desgaste que sufren las células somáticas como «efecto secundario» de su trabajo fisiológico^{34,35} están de acuerdo con los datos obtenidos por Loeb y Northrop³⁶ y Alpatov y Pearl³⁷ en el poiquilotermo *Drosophila melanogaster* (confirmados por estudios de nuestro laboratorio³⁸⁻⁴⁰ que muestran que, en el rango de temperatura al que estos insectos están adaptados, la duración de su vida es inversamente proporcional a la temperatura ambiente).

Aunque se ha propuesto que reacciones de desnaturalización de las proteínas por el calor podrían estar implicadas en el envejecimiento acelerado de insectos y otros poiquilotermos mantenidos a temperaturas relativamente elevadas⁴⁰, estas reacciones probablemente no tienen un papel importante en el envejecimiento a causa de sus altas energías de activación¹⁰. Además, como ya demost

ron Loeb y Northrop³⁶, la energía de activación del proceso de envejecimiento en *Drosophila* es más parecida a la de reacciones catalizadas por enzimas que a las que desnaturalizan las proteínas.

De acuerdo con lo anterior y con la teoría del *rate-of-living*, de Pearl³⁵, nuestros estudios han confirmado que el efecto de los cambios en la temperatura ambiente sobre la longevidad de las *Drosophila* adultas se debe al efecto modulador de estos cambios sobre el consumo de oxígeno de este insecto (Miquel et al^{38,39}) igual que ocurre con otros poiquilotermos. Además, el consumo de oxígeno *in vivo* por miligramo de peso corporal de *Drosophila* adulta tiene una relación inversa con la duración de la vida en distintas cepas de este insecto mantenidas a la misma temperatura de 25 °C⁴¹. Y esta relación inversa entre metabolismo aerobio y longevidad también se observa en moscas *Drosophila* alojadas en satélites espaciales, en los que, a causa de la acción estresante de la ingravidez, realizan un vuelo desordenado que aumenta su consumo de oxígeno⁴². Los probables mecanismos por los que el consumo de oxígeno (con formación de radicales libres y consiguiente estrés oxidativo) influye en la longevidad y causa el envejecimiento celular se presentan seguidamente.

MECANISMOS DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR

Conceptos de Weissman y Minot sobre el envejecimiento *in vivo* de las células germinales y las células somáticas diferenciadas terminalmente

De acuerdo con Weissman³⁴, definir los mecanismos del envejecimiento celular es el principal objetivo de la investigación gerontológica. Por ello, el envejecimiento celular *in vivo* e *in vitro* ha sido objeto de intensa investigación.

Numerosos estudios demuestran la coexistencia en los tejidos animales de células diferenciadas, que envejecen (figs. 1 y 2), y células indiferenciadas que, al preservar su capacidad mitótica, pueden regenerarse durante el proceso de crecimiento y división celular y no muestran signos de envejecimiento morfológico, bioquímico o funcional (fig. 2). Ya en 1891 las diferencias entre estos dos tipos celulares inspiraron el siguiente comentario de Weissman³⁴, que a pesar del tiempo transcurrido no ha perdido validez: «Consideremos qué sucedió para que los animales y las plantas multicelulares, que surgieron de las formas de vida unicelular e inmortal, perdieran su capacidad de vivir para siempre. La explicación deriva del principio de la división del trabajo que apareció en los organismos multicelulares en una temprana etapa evolucionaria y ha producido estructuras cada vez más complejas (...). Pronto las células somáticas sobrepasaron en número a las reproductoras y se subdividieron, a causa del principio de la división del trabajo, en sistemas de tejidos claramente diferenciados.

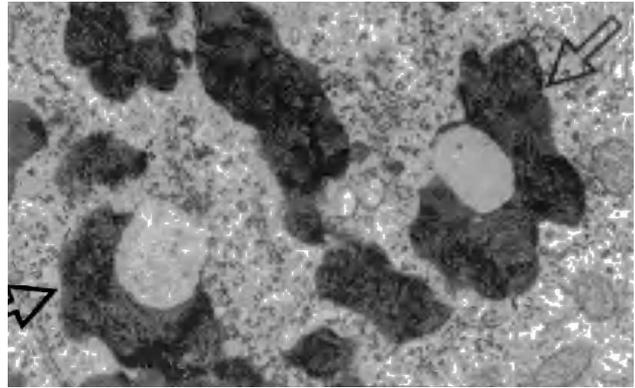
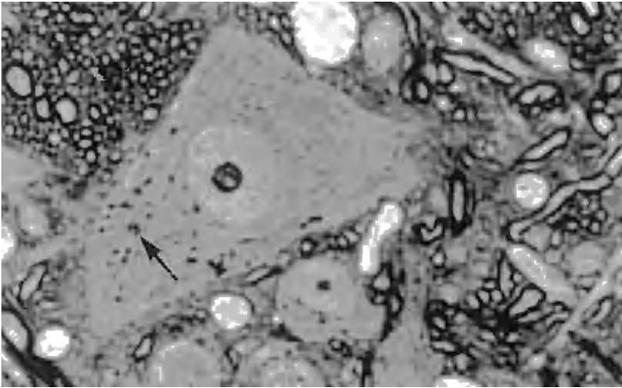


Figura 1. La acumulación de pigmento de envejecimiento (lipofuscina) en las células posmitóticas terminalmente diferenciadas es uno de los efectos más evidentes de la senescencia normal. Esto apoya los conceptos de Weissman y Minot sobre el contraste entre el envejecimiento de las células somáticas diferenciadas y la supervivencia de las células germinales indiferenciadas. Puesto que la mayoría del pigmento deriva de una degeneración autofágica de las mitocondrias que han sufrido estrés oxidativo, nuestros datos apoyan la teoría mitocondrial del envejecimiento. Izquierda: gránulos de lipofuscina (flechas) en una neurona del núcleo vestibular lateral del cerebro de una ratona de 8 meses de edad. (500). Derecha: estructura de la lipofuscina en una neurona piramidal del hipocampo de un ratón de 30 meses. Las flechas señalan 2 gránulos de pigmento que contienen gotas de grasa. (22.000). (Modificado de Miquel³.)

Simultáneamente, se perdió el poder regenerador de partes considerables del organismo, mientras se concentraba en las células sexuales la capacidad de reproducir el organismo entero».

Estas opiniones se complementan con el concepto propuesto por Minot⁴³ en 1907 de que «el envejecimiento es el precio pagado por la diferenciación celular». Por ello, la investigación de los cambios que muestran las células diferenciadas con el paso del tiempo tiene un gran interés para la comprensión del proceso de envejecimiento, pues numerosos datos apoyan la hipótesis de que dicho proceso se asocia con la incapacidad de las células diferenciadas de contrarrestar con una eficacia del 100% el desorden que acumulan como consecuencia no programada de su actividad metabólica (fig. 2).

Teoría del límite mitótico de Hayflick

Según las observaciones de Moorhead y Hayflick⁴⁴, los fibroblastos humanos mantenidos en cultivo pierden su capacidad mitótica tras aproximadamente 50 divisiones *in vitro*. La hipótesis inicial⁴⁵ mantenía erróneamente que la pérdida de capacidad mitótica equivale a envejecimiento celular, y este malentendido pudo dificultar la definición de mecanismos del envejecimiento de las células, de aplicación general tanto en un medio de cultivo como en su hábitat normal en los tejidos de los metazoos. Así, según el prestigioso gerontólogo Bernard L. Strehler¹², estos estudios sugieren que el simple paso del tiempo (aunque no haya división celular) reduce el número de mitosis posteriores que muestran las células. Por ello, concluye Strehler: «No existe ninguna razón para creer que el envejecimiento clonal o pérdida de capacidad mitótica es causa importante del envejecimiento del organismo ni de sus importantes poblaciones de células germinales, tales como las que proporcionan su capacidad regeneradora a la piel, el intestino y la médula ósea (...). No parece razona-

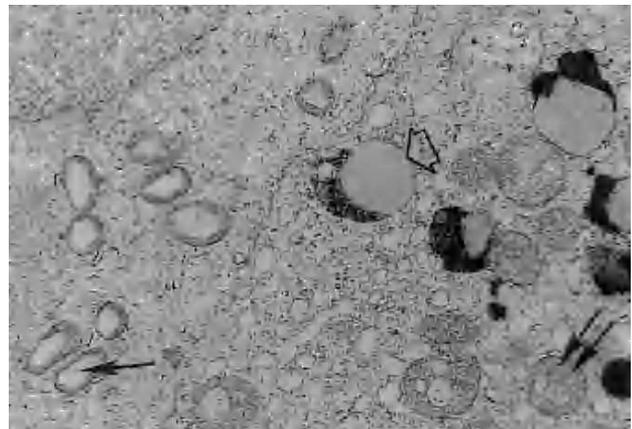


Figura 2. Esta microfotografía de testículo de ratón apoya la hipótesis que propone que los efectos desorganizadores de los radicales libres de oxígeno en las células están relacionados con el grado de diferenciación de dichas células. Así, en el testículo, nuestros datos muestran que con el paso del tiempo se desorganizan las células diferenciadas terminalmente (célula de Sertoli, a la derecha) mientras que no envejece la población de espermatozoides, que se renueva a través de su frecuente división celular. (Área citoplasmática de un espermatozoides, a la izquierda.) Las flechas finas señalan las mitocondrias en ambos tipos celulares y la flecha ancha un gránulo de lipofuscina similar a los que se muestran en la neurona de la figura 1. 17.000. (Modificado de Miquel et al¹.)

ble que el límite de Hayflick se aplique a células normales en el cuerpo».

De acuerdo con estos comentarios, se acepta que los cultivos experimentan una diferenciación terminal *in vitro* similar a la que se observa en muchos tipos de células *in vivo*, como las células hematopoyéticas o los mioblastos. Los datos obtenidos por microscopía electrónica en nuestro laboratorio apoyan esta hipótesis, pues numerosos fibroblastos mantenidos en cultivo muestran fibras de

colágeno y cilios, que son estructuras características de los fibroblastos diferenciados⁴⁶. Además, se ha demostrado que la enzima respiratoria mitocondrial citocromo oxidasa aumenta su actividad específica en un 300% en los fibroblastos que «envejecen» *in vitro*⁴⁷. Puesto que la biogénesis mitocondrial y la diferenciación celular *in vivo* también se acompañan de un marcado aumento de los valores de enzimas respiratorias, estos datos también apoyan la hipótesis de que las células dejan de dividirse porque se diferencian irreversiblemente. Por ello, es probable que, en vez de estudiar el envejecimiento, lo que a menudo se está investigando *in vitro* son los mecanismos de la diferenciación celular.

Papel de los telómeros y la telomerasa

Según se ha revisado anteriormente, los telómeros (secuencias repetidas de ADN presentes en los 2 extremos de los cromosomas) se acortan cada vez que una célula se divide, y este acortamiento «cuenta» el número de mitosis que ha experimentado una población celular⁴⁸⁻⁵⁰. Los telómeros protegen a los cromosomas y apoyan la transcripción exacta del ADN nuclear, y cuando se vuelven demasiado cortos para permitir una nueva división celular se observa el fin de la capacidad mitótica *in vitro*⁴⁸. Por el contrario, las células inmortales se protegen contra el acortamiento de los telómeros gracias a la actividad de la telomerasa, que reemplaza las secuencias teloméricas perdidas. Así, manteniendo telómeros de tamaño constante se preserva la capacidad de división celular *in vitro*^{48,49}, de acuerdo con la observación de que aumenta la longevidad de dichos cultivos si se introduce telomerasa en fibroblastos humanos mantenidos en cultivo⁵¹. Esto apoya la hipótesis de Dice⁵² de que un acortamiento excesivo de los telómeros bloquea la mitosis y desencadena el envejecimiento celular, probablemente precedido, según ya hemos comentado al revisar la teoría del límite de Hayflick, de un proceso de diferenciación *in vitro*.

En cuanto a la implicación de los telómeros y la telomerasa en el envejecimiento celular *in vivo* según Goyns⁵⁰: a) en las células posmitóticas (de escasa o nula proliferación), los telómeros no se acortan significativamente durante la vida del animal; b) las células germinales (que proliferan con mucha frecuencia) muestran una gran actividad de telomerasa, que preserva su capacidad mitótica, y c) los fibroblastos, células epiteliales y otras células intermitóticas (que experimentan un número relativamente escaso de divisiones a lo largo de la vida en el organismo adulto) carecen de telomerasa, probablemente porque no la necesitan, ya que no llegan a agotar su capacidad mitótica *in vivo*.

Además, la telomerasa sí que puede tener un papel importante preservando la composición tisular y la función de ciertos sistemas, interviniendo especialmente en el envejecimiento de algunos tipos celulares del sistema inmunológico. Así, en la mayoría de las poblaciones de linfocitos se reactiva la telomerasa cuando son estimulados con

mitógenos, lo que les permite activar las mitosis con el consiguiente aumento del número de linfocitos y preservación funcional⁵³. Por otra parte, según Effros⁵⁴, la imposibilidad de reactivar la telomerasa lleva a la senescencia a algunos tipos de linfocitos como las células T.

En resumen, a pesar del indudable interés de los telómeros y telomerasa en relación con los procesos normales de la mitosis y diferenciación celular⁵⁵ y algunas alteraciones fisiopatológicas de dichos procesos, Carlson y Riley⁵⁶ concluyen que no hay prueba de que las relaciones entre los telómeros y la mortalidad *in vitro* de las células en cultivo sean relevantes para comprender el envejecimiento del organismo, pues incluso en tejidos de alto *turnover*, los mamíferos no mueren como resultado del agotamiento de su potencial mitótico. Por ello, no parece justificado proponer una teoría general del envejecimiento *normal* basada en la acción de los telómeros y la telomerasa.

Muerte celular apoptótica

Según la reciente revisión de Zhang et al⁵⁷, la apoptosis o *muerte celular programada* (a menudo inducida por glucocorticoides, estrés oxidativo y déficit de energía celular) ha sido implicada en la senescencia *in vitro* de fibroblastos, linfocitos T, células epiteliales y endoteliales, y neuronas.

En relación con el envejecimiento *in vivo*, ya que aparecen nuevas neuronas en el hipocampo de roedores, monos y sujetos humanos adultos⁵⁸⁻⁶⁰ mientras que el número de neuronas del hipocampo permanece aproximadamente constante a lo largo de la vida⁶⁰, es probable que cierto número de neuronas mueran por apoptosis en el hipocampo así como en otras áreas del sistema nervioso. No obstante, aún no se ha valorado la repercusión funcional de esta pérdida de neuronas, y se acepta generalmente que el efecto más importante de la senescencia neuronal es la pérdida de conexiones sinápticas⁶¹.

En contraste con la escasa frecuencia de muerte apoptótica en las células que nunca se dividen en la edad adulta o lo hacen muy raramente, la apoptosis es un mecanismo esencial para evitar la acumulación de un exceso de células en las poblaciones celulares que proliferan a menudo. Aparentemente, si en los organismos viejos se observa un aumento del número de células apoptóticas en los tejidos que preservan la mitosis, esto puede ser beneficioso, pues al envejecer se acumulan células con lesiones genéticas, que conviene eliminar para prevenir las neoplasias⁶².

En resumen, los datos sugieren que si la producción de nuevas células a través de la mitosis normal equilibra la pérdida de células por apoptosis, la apoptosis tendrá un efecto positivo, pues se eliminarán células lesionadas (que pueden dar lugar a tumores) y el tejido continuará funcionando normalmente. En cambio, si la apop-

tosis se desequilibra aumentando con la edad, un exceso de actividad apoptótica no compensado por las mitosis, con la consiguiente disminución de la población celular, tendrá un efecto negativo sobre el rendimiento fisiológico⁶³.

Teorías de los radicales libres (de Denham Harman) y de la «toxicidad residual» del oxígeno (de Rebeca Gerschman)

Estos 2 autores, trabajando independientemente en la Universidad de California, en Berkeley, publicaron en las décadas de los años cincuenta y sesenta una serie de trabajos que implicaban a los radicales libres del oxígeno (y su toxicidad) en el envejecimiento celular. En un artículo de 1956 Harman⁶⁴ propuso que los radicales libres (fragmentos moleculares muy reactivos que pueden dar lugar a reacciones desorganizadoras) no sólo podían causar el envejecimiento sino también otros procesos degenerativos, como el cáncer, la arteriosclerosis, la amiloidosis y la inmunodeficiencia. Según Harman⁶⁵, estos síndromes son el resultado de las reacciones nocivas de los radicales libres que tienen lugar continuamente en las células y los tejidos, y Harman también propuso que la desorganización de las mitocondrias causada por los radicales libres podría ser «el reloj del envejecimiento».

Los conceptos similares de Rebeca Gerschman⁶⁶ derivan de sus estudios sobre *el efecto del oxígeno*, es decir del hecho de que la acción nociva de la radiación ionizante aumenta en presencia del oxígeno, mientras que la falta de este gas tiene un efecto protector en las células irradiadas. No había una explicación satisfactoria para este fenómeno hasta que Rebeca Gerschman desarrolló una teoría general del *envenenamiento por oxígeno*, que mantiene que la toxicidad de este gas está ligada a un aumento en la concentración intracelular de radicales libres, igual que sucede en las células irradiadas. Esto la llevó a extrapolar que la toxicidad del oxígeno de la atmósfera causa el envejecimiento, debido a que las defensas antioxidantes del organismo no contrarrestan exactamente el ataque oxidativo. Por lo tanto, «las oxidaciones incontroladas que derivan de una pequeña insuficiencia en el sistema de defensa antioxidante, podrían ser un factor crucial en el proceso del envejecimiento y en la duración de la vida».

Las teorías de Harman y Gerschman aportan una explicación razonable de ciertos cambios celulares que ocurren al envejecer, pero no resuelven dos problemas fundamentales: a) ¿por qué las células de los metazoos, a diferencia de los organismos unicelulares, son incapaces de protegerse eficazmente contra las lesiones causadas por los radicales libres?, y b) ¿por qué surgieron en el curso de la evolución biológica las células destinadas a envejecer?

Según comentaremos, nuestro concepto⁶⁷ de que las ROS que se forman en las mitocondrias de las células di-

ferenciadas de los metazoos lesionan su mtADN, con resultante pérdida de regeneración mitocondrial y descenso de la síntesis de adenosín trifosfato (ATP), puede ofrecer una respuesta lógica a estas preguntas.

Teoría integradora del «estrés oxidativo/lesión genética mitocondrial» del envejecimiento de las células diferenciadas

Esta teoría que integra en su denominación al agente agresor (ROS) y a la diana fundamental de la agresión (mtADN), y es compatible con los conceptos de Harman, Pearl, Minot y otras teorías clásicas, tiene su origen en los estudios de nuestro laboratorio, que fue el primero en demostrar que las células terminalmente diferenciadas de *Drosophila* acumulan al envejecer el residuo de membranas oxidadas lipofuscina, igual que las neuronas de los sujetos humanos⁶⁸. También demostramos la formación de lipofuscina (o pigmento del envejecimiento) en otro tipo de célula somática terminalmente diferenciada: la célula de Sertoli (fig. 2) de testículo de ratones viejos⁶⁹. Estos datos, y nuestra observación de que la lipofuscina deriva de membranas mitocondriales oxidadas igual en los insectos que en los mamíferos, nos llevó a proponer en 1980 una teoría mitocondrial del envejecimiento⁶⁷, incluida por Medvedev⁵ en su clásica revisión de 1999 en el grupo de «teorías que explican los cambios que ocurren a los niveles genético y celular». A diferencia del concepto inicial de Harman⁷⁰, que proponía como un mecanismo fundamental del envejecimiento la desorganización de mitocondrias en toda clase de células (en desacuerdo con los datos de nuestro laboratorio), nuestro concepto específica que la desorganización mitocondrial causante del envejecimiento sólo ocurre en las células somáticas diferenciadas (fig. 3).

Según la presentación inicial de esta teoría⁶⁷, el envejecimiento está ligado a la desorganización por los radicales libres de oxígeno de las membranas y genoma de las mitocondrias de las células terminalmente diferenciadas. También señalábamos que las células que se dividen frecuentemente están protegidas contra el envejecimiento por su moderado consumo de oxígeno y la regeneración de las mitocondrias que acompaña a la mitosis. Por el contrario, las células posmitóticas fijas requieren un intenso metabolismo aerobio para sintetizar en la cadena respiratoria mitocondrial el abundante ATP que apoya su función especializada (con la consiguiente formación de altos niveles de radicales libres de oxígeno) y además han perdido la capacidad de renovar sus orgánulos a través de los procesos de crecimiento celular y mitosis.

También comentábamos⁶⁷ que, como el mtADN es necesario para el mantenimiento de la población mitocondrial, las lesiones oxidativas de dicho genoma pueden bloquear el *turnover* mitocondrial, sentando así las bases para una progresiva desorganización oxidativa de los lípidos y proteínas de las membranas mitocondriales. Este proceso lleva a la digestión autofágica de las mitocon-

drias, con la consiguiente disminución en la síntesis de ATP y de las proteínas necesarias para el trabajo celular especializado y acumulación de pigmento del envejecimiento (fig. 3).

En versiones posteriores de nuestra teoría^{7,8,71-73} nos hemos centrado en los mecanismos genéticos del envejecimiento, comentando que, a causa del entorno oxidativo/mutagénico y relativa falta de protección del genoma mitocondrial de las células diferenciadas, este genoma es más vulnerable al ataque oxidativo que el genoma nuclear, pues está situado cerca de los lugares de intensa producción de ROS en la cadena respiratoria y carece de la protección por histonas y de mecanismos de reparación eficaces. Por ello, las mitocondrias de estas células sufren con el paso del tiempo mutaciones u otros cambios que impiden su regeneración con el consiguiente descenso de rendimiento bioenergético y función celular. Y en niveles más altos de organización biológica tiene lugar un descenso de la capacidad funcional de los órganos, sistemas fisiológicos y organismos, que podría ser frenado mediante la suplementación de la dieta con antioxidantes eficaces a nivel mitocondrial⁷³.

Conceptos similares sobre el papel de las mitocondrias en el envejecimiento han sido publicados por numerosos autores que incluyen a Richter⁷⁴, Linnane et al⁷⁵, Trounce et al⁷⁶, y Kowald y Kirkwood⁷⁷.

BIBLIOGRAFÍA

- Miquel J, Economos AC, Johnson JE Jr. A systems analysis-thermodynamic view of cellular and organismic aging. En: Johnson JE Jr, editor. Aging and cell structure. Vol 2. New York: Plenum Press; 1984. p. 247-80.
- Miquel J. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. En: Miquel J, Quintanilha A, Weber H, editors. CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. Boca Raton: CRC Press; 1989. p. 3-13.
- Miquel J. Envejecimiento celular y molecular: teorías del envejecimiento. En: Guillén Lera F, Ruipérez Cantera I, editores. Manual de geriatría. 3.ª ed. Barcelona: Salvat Editores; 2002. p. 29-42.
- Miquel J. Teorías del envejecimiento biológico. En: Salvador-Carulla I, Cano Sánchez A, Cabo Soler JR, Gómez Gómez R, Alonso Trujillo F, Colomer Bosch R, et al, editores. Longevidad: tratado integral sobre salud en la segunda mitad de la vida. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004. p. 46-54.
- Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of aging. Biol Rev. 1990;65:375-98.
- Vijg J, Müller WEG. The science of aging and the need for a mechanistic approach. Mech Ageing Dev. 2000;114:1-3.
- Miquel J, Fleming JE. Theoretical and experimental support for an oxygen radical-mitochondrial damage hypothesis of cell aging. En: Johnson JE Jr, Harman D, Walford R, Miquel J, editors. Free radicals, aging and degenerative diseases. New York: Alan R. Liss; 1986. p. 51-74.
- Miquel J. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. Arch Gerontol Geriatr. 1991;12:99-117.
- Strehler BL. Origin and comparison of the effects of time and high-energy radiation on living systems. Q Rev Biol. 1959;34:117-42.
- Strehler BL. Time, cells and aging. 2nd ed. New York: Academic Press; 1977.
- Miller JG. Living systems. New York: Mc Graw-Hill; 1978.
- Strehler BL. Understanding aging. En: Barnett YA, Barnett CR, editors. Aging methods and protocols. Totowa: Humana Press; 2000. p. 1-19.
- Medawar PB. An unsolved problem of biology. London: Lewis; 1951.
- Williams GC. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. Evolution. 1957;2:398-411.
- Orgel LE. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. Proc Natl Acad Sci USA. 1963;49:517-21.
- Fleming JE, Quatrochy E, Latter G, Miquel J, Marcuson R, Zuckerkandl E, et al. Age dependent changes in proteins of *Drosophila melanogaster*. Science. 1986;231:1157-9.
- Benard C, Hekimi S. Long-lived mutants, the rate of aging, telomeres and the germline in *Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev. 2002;123:869-80.
- Vijg J. Profiling aging by gene arrays. Mech Ageing Dev. 1999;112:1-4.
- Han E-S, Hilsenbeck SG. Array-based gene expression profiling to study aging. Mech Ageing Dev. 2001;122:999-1018.
- Yang Y, Wilson DL. Isolating aging mutants; a novel method yields three strains of the nematode *Caenorhabditis elegans* with extended life spans. Mech Ageing Dev. 2000;113:101-16.
- Hekimi S, Burgess J, Bussiere F, Meng Y, Benard C. Molecular genetics of life span in *Caenorhabditis elegans*: molecular diversity, physiological complexity, mechanistic simplicity. Trends Genet. 2001;17:712-8.
- Muiras ML. Mammalian longevity under the protection of PARP-1's multifacets. Ageing Res Rev. 2003;129-48.
- Martin GM. Keynote: mechanisms of senescence—complicationists versus simplificationists. Mech Ageing Dev. 2002;123:65-73.
- Shock NW. Physiological aspects of aging. J Am Diet Assoc. 1970;50:6:191-7.
- Miquel J, Blasco M. A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. Exp Gerontol. 1978;13:389-96.
- Gilad MG, Gilad VH. Strain, stress, neurodegeneration and longevity. Mech Ageing Dev. 1995;78:75-83.
- De la Fuente M, Hernanz A, Medina S, Guayerbas N, Fernández B, Viveros MP. Characterization of monoaminergic systems in brain regions of prematurely aging mice. Neurochem International. 2003;43:165-72.
- Fabris N. Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to aging. Arch Gerontol Geriatr. 1991;12:219-30.
- Guayerbas N, Catalán N, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. Brain Behav Res. 2002;134:41-8.
- De la Fuente M, Guayerbas N, Catalán MP, Victor VM, Miquel J. The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve the immune functions is higher in aged than in adult mice. Free Rad Res. 2002;36:119-26.
- Meites J, Goya R, Takahashi S. Why the endocrine system is important in aging processes. Exp Gerontol. 1987;22:1-15.
- Trimmer EJ. Rejuvenecimiento. Barcelona: Plaza & Janés; 1972. p. 129-53.
- Hayflick L. Theories of biological aging. Exp Gerontol. 1985;20:145-59.
- Weissman A. Essays upon heredity and kindred biological problems. London-New York: Oxford University Press-Clarendon; 1891.
- Pearl R. The rate of living. London: University of London Press; 1928. p. 50.
- Loeb J, Northrop JH. On the influence of food and temperature upon the duration of life. J Biol Chem. 1917;32:103-21.
- Alpatov WW, Pearl R. Experimental studies on the duration of life. XII. Influence of temperature during the larval period of adult life of *Drosophila melanogaster*. Am Nat. 1929;63:37-67.
- Miquel J, Lundgren PR, Bensch KG, Atlan H. Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. Mech Ageing Dev. 1976;5:347-70.
- Fleming JE, Miquel J. Effects of temperature on the metabolic rate of *Drosophila*. Experientia. 1983;39:267-8.
- Atlan H, Miquel J, Helmle LC, Dolkas CB. Thermodynamics of aging in *Drosophila melanogaster*. Mech Ageing Dev. 1976;5:371-87.
- Miquel J, Binnard R, Fleming J. Role of metabolic rate and DNA repair in *Drosophila* aging: implications for the mitochondrial mutation theory of cell aging. Exp Gerontol. 1983;18:167-71.
- Miquel J, Souza KA. Gravity effects on reproduction, development and aging. En: Bonting LS, editor. Advances in space biology and medicine. New York: JAI Press; 1991. p. 71-97.

43. Minot CS. The problem of age, growth and age. *Pop Sci Monthly*. 1907;71:509-27.
44. Moorhead PS, Hayflick L. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621.
45. Hayflick L. The limited in vitro life span of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965;37:614-36.
46. Johnson JE Jr. Fine structure of IMR-90 cells in culture as examined by scanning and transmission electron microscopy. *Mech Ageing Dev*. 1979;10:405-13.
47. Sun AS, Aggarwal BB, Packer L. Enzyme levels of normal human cells: aging in culture. *Arch Biochem Biophys*. 1975;170:1-4.
48. Olovnikov AM. A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*. 1973;41:181-90.
49. Kang MK, Swee J, Kim RH, Baluda MA, Park NH. The telomeric length and heterogeneity decrease with age in normal human oral keratinocytes. *Mech Ageing Dev*. 2002;123:585-92.
50. Goyns MH. Genes, telomeres and mammalian ageing. *Mech Ageing Dev*. 2002;123:791-9.
51. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998;79:349-52.
52. Dice JF. Cellular and molecular mechanisms of ageing. *Physiol Rev*. 1993;73:149-59.
53. Buchkovich KJ, Greider MA. Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells. *Mol Cell Biol*. 1996;7:1443-54.
54. Effros RB. Telomere/telomerase dynamics in T cells: impact on immunological memory. *Gerontology*. 2001;47 Suppl 1:17.
55. Landsdorp PM. Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mech Ageing Dev*. 2000;118:23-34.
56. Carlson JC, Riley JCM. A consideration of some notable aging theories. *Exp Gerontol*. 1998;33:127-34.
57. Zhang J, Patel JM, Block ER. Enhanced apoptosis in prolonged cultures of senescent porcine pulmonary artery endothelial cells. *Mech Ageing Dev*. 2002;123:613-25.
58. Rapp PR, Gallagher M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1996;93:9926-30.
59. Gould E, Tanapt E, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1998;95:3168-71.
60. Erikson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med*. 1998;4:1313-17.
61. Kullberg S, Ramirez-León V, Johnson H, Ulfhake B. Decreased axosomatic input to motoneurons and astrogliosis in the spinal cord of aged rats. *J Gerontol*. 1998;53:B369-79.
62. Holt PR. Diet restriction increases apoptosis in the gut of aging rats. *J Gerontol*. 1998;53:B168-72.
63. Zhang Y, Herman B. Apoptosis and successful aging. *Mech Ageing Dev*. 2002;123:563-5.
64. Harman D. A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11:298-300.
65. Harman D. Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging, and disease processes. En: Johnson JE Jr, Walford R, Harman D, Miquel J, editors. *Free radicals, aging and degenerative diseases*. New York: Alan R. Liss; 1986. p. 3-49.
66. Gerschman R. Man's dependence on the earthly atmosphere. En: Schaeffer KS, editor. *Proc 1st Symp Submarine and Space Medicine*. New York: MacMillan; 1962. p. 475.
67. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*. 1980;15:575-91.
68. Miquel J, Oro J, Bensch KG, Johnson JE Jr. Lipofuscin: fine structural and biochemical studies. En: Pryor W, editor. *Free radicals in biology*. New York: Academic Press; 1977. p. 133-82.
69. Miquel J, Lundgren PR, Johnson JE. Spectrophotometric and electron microscopic study of lipofuscin accumulation in the testis of aging mice. *J Gerontol*. 1978;33:5-19.
70. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*. 1972.
71. Miquel J. An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutation Research*. 1992;275:209-16.
72. Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol*. 1998;33:113-26.
73. Miquel J. Can antioxidant diet supplementation protect against age-related mitochondrial damage? *Ann NY Acad Sci*. 2002;959:508-16.
74. Richter C. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett*. 1988;241:1-5.
75. Linnane AW, Ozawa T, Marzuki S, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*. 1989;1:64-5.
76. Trounce I, Byrne E, Marzuki S. Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in aging. *Lancet*. 1989;1:637-9.
77. Kowald A, Kirkwood TBL. Accumulation of defective mitochondria through delayed degradation of damaged organelles and its possible role in the aging of fixed post-mitotic and dividing cells. *J Theor Biol*. 2000;202:145-60.