

## Biología del envejecimiento

Viviana Pérez<sup>1</sup>, Felipe Sierra<sup>2</sup>.

### *Biology of aging*

*The study of biological aging has seen a spectacularly fast progress in the last decade. Besides a better understanding and comprehension of physiological aspects, an important advance has been the identification of at least a hundred different genes which control the process of aging. Their mechanism of action falls within the expectations from a handful of theories which attempt to provide a global explanation of the phenomenon of aging, including free radicals, cell senescence and loss of regenerative capacity through the activation of stem cells. In this review we will concentrate in these biological aspects, with a special emphasis on animal models used to study both the genetics and physiology of aging, as well as experimental approaches to test the aforementioned theories. It should be emphasized that, while the emphasis is in purely biological aspects of the process, the fast pace of aging of the world's population, including Chile, needs a rapid advance also in our understanding of its social and economic implications (Rev Méd Chile 2009; 137: 296-302).*

**(Key words:** Aging; Genes; Stem cells)

Recibido el 16 de mayo, 2008. Aceptado el 24 de octubre, 2008.

<sup>1</sup>Barshop Institute for Longevity and Aging Studies, The University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas, USA. <sup>2</sup>National Institute on Aging, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

El envejecimiento afecta prácticamente a todas las especies existentes en nuestro planeta, y a pesar de los temores e incertidumbres asociados a la vejez, aún es un estado al que todo ser humano desea llegar. El envejecimiento ha intrigado a filósofos desde tiempos inmemorables, y sin embargo, es una de las ramas de la biología que ha resistido los esfuerzos para ser catalogada, o incluso definida. Diversos pensadores utilizan distintas definiciones, pero para los fines de este escrito, definiremos el envejecimiento como un proceso paulatino y gradual de deterioro de la capacidad funcional del organismo, posterior a la madurez, y que a la larga conduce a la muerte del mismo.

Es importante destacar que esta definición excluye explícitamente las enfermedades asociadas al envejecimiento. El envejecimiento no es una enfermedad, y eso explica en parte la resistencia de esta etapa de la vida a ser definida en forma categórica. Sin embargo, en la psiquis humana en general, se

asocia al envejecimiento con enfermedades crónicas, y la verdad es que actualmente es raro encontrar "vejez" como causa de muerte en un certificado de defunción. Los pacientes de edad avanzada sucumben a enfermedades, entre las cuales cabe destacar las cardiovasculares, las demencias, cáncer, etc.<sup>1</sup>. Estas son enfermedades asociadas al envejecimiento, ya que el proceso de deterioro de la capacidad funcional deja al individuo expuesto a que se manifiesten los síntomas característicos de ellas. Pero las enfermedades en sí no son parte del proceso de envejecimiento propiamente tal, sino consecuencia del mismo. Además de las enfermedades nombradas arriba, y cuyo desenlace suele ser la muerte, hay otras muchas enfermedades y condiciones asociadas al envejecimiento que, sin ser directamente causantes de muerte, sí son responsables en gran parte del deterioro en la calidad de vida del anciano. Entre éstas podremos destacar la sarcopenia, osteoporosis, artritis y enfermedades autoinmunes. Finalmente, es importante destacar que la calidad de vida se encuentra desmedrada además por otros factores biológicos tales como la falta de resistencia a infecciones (debido a la llamada "inmunosenescen-

*Correspondencia a:* Dr. Felipe Sierra, Ph.D. National Institute on Aging/NIH. 7201 Wisconsin Ave, Suite 2C231. Bethesda, MD 20892. E mail: sierraf@nia.nih.gov

cia”) y la pérdida de capacidad regenerativa, lo que lleva por ejemplo a una pobre respuesta de curación de heridas. En consecuencia, podemos decir que otro aspecto importante de la definición de envejecimiento es la reducción paulatina de la resiliencia homeostática, es decir, la capacidad de recuperar los parámetros fisiológicos cuando éstos se han alterado. Factores sociales como soledad y depresión no serán tocados en este escrito, aunque ellos contribuyen en forma especialmente fuerte a la pérdida de calidad de vida del adulto mayor.

### ¿POR QUÉ ESTUDIAR EL ENVEJECIMIENTO?

La idea de vencer el envejecimiento y lograr la inmortalidad ha apasionado a la humanidad por milenios. Sin embargo, hasta hace poco, la actitud predominante ha sido que “el envejecimiento ocurre de manera espontánea, al igual que envejece un auto o una lavadora, y por lo tanto no es un tema que se preste a la investigación mecanística”. Sin embargo, a pesar de una apariencia en principio estocástica, el envejecimiento de diversas especies así como de individuos dentro de una especie ocurre de manera eminentemente reproducible. Mientras es verdad que diferentes individuos sucumben a diversas enfermedades, el proceso mismo de envejecimiento es muy similar entre los individuos, e incluso entre las especies. Estas observaciones sugieren la posibilidad de mecanismos comunes, sean genéticos, celulares o de otra naturaleza, y de ser así, entonces cabe el estudiar el proceso desde el punto de vista molecular o celular.

No sólo es entonces posible estudiar el fenómeno bajo condiciones de laboratorio, sino además es imprescindible hacerlo en este momento de la historia de la humanidad. El aumento rápido y acelerado de la longevidad es un fenómeno que se está observando a nivel mundial, y no sólo en los países más desarrollados. De hecho, los grupos etarios que demuestran el mayor crecimiento proporcional son justamente aquellos de individuos mayores de 65 años e incluso aquellos mayores a 85 años<sup>1</sup>. Es además interesante señalar que un análisis de los records de expectativa de vida en diferentes países muestra un aumento perfectamente lineal de casi 3 meses por año, o 2,5 años por década, desde 1840 hasta el presente<sup>2</sup>. Esto ocurre a pesar de cambios en el país que ostente el record cada año [actualmente es Japón para las

mujeres (85,5 años) e Islandia para hombres (80,2 años)]. Vivimos entonces en una sociedad que envejece a una velocidad acelerada, y esto implica una necesidad de comprender tanto los aspectos fisiológicos como de comportamiento de los individuos de edad avanzada, así como también los efectos a nivel social y económico. De hecho, mientras tomó a Francia 115 años para doblar su población de 65+ (de 7% a 14%), se espera que Chile lo haga en meros 27 años<sup>3</sup>.

Como hemos mencionado antes, la gente no muere “de vieja”, sino más bien, muere de las complicaciones relacionadas a las enfermedades crónicas asociadas a la vejez. En concordancia con ese hecho, la investigación moderna se ha abocado a comprender (y en lo posible bloquear) el desarrollo de dichas patologías, una a una. Es así como gran esfuerzo ha sido dedicado a problemas como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, pulmonares, etc. Sin embargo, la aparición de dichas enfermedades tiene una base común, que es el fenómeno de envejecimiento en sí. A manera de ilustración: sabemos que el colesterol es uno de los principales factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, un individuo de 20 años puede comer comida chatarra a diario, sin sufrir consecuencias cardiovasculares inmediatas; la enfermedad se desatará sólo cuando el individuo alcance una edad madura. En otras palabras, la edad es un factor de riesgo mucho mayor que el colesterol. Basados en ese argumento, podría ser más provechoso para la humanidad el tratar de comprender las bases moleculares del envejecimiento, que es el proceso que se encuentra a la base de todas o al menos gran parte de las enfermedades crónicas propias de la vejez. Específicamente, debemos considerar que el curar cualquiera de las enfermedades crónicas de mayor importancia (cáncer, Alzheimer, cardiovasculares) sólo llevaría a un aumento en la vida media de la población de unos pocos (3 a 5) años<sup>4</sup>. En contraste, si logramos desentrañar el proceso de envejecimiento, podremos aumentar significativamente las expectativas de vida de la población total. Esta idea da también origen a un corolario interesante: si la medicina lograra, por ejemplo, eliminar de la faz de la tierra todos los problemas cardiovasculares, los años ganados (por una fracción de la población, aquella que de otro modo habría sucumbido a problemas cardiovasculares) serán pasados en un estado de desmoronamiento general, ya que todo el

resto de nuestro organismo estará ya deteriorado hasta un punto cercano a su quiebre. Al contrario, si podemos posponer el arribo del envejecimiento, en teoría esto agregaría años saludables a nuestra vida. Esta idea ha recibido el nombre de "dividendo de la longevidad"<sup>5</sup>.

#### MODELOS ANIMALES DE LONGEVIDAD

El único método no-genético de aumentar la longevidad en diversas especies es la restricción calórica<sup>6</sup>. Desde los años '30, los estudios de McCay y cols<sup>7</sup> demostraron que la restricción calórica en 30%-40% de la ingesta *ad libitum* lleva a un aumento en la longevidad máxima y media de ratas. Estas observaciones han sido corroboradas en una variedad de especies (aunque no en todas)<sup>8</sup>. El mecanismo involucrado no ha sido esclarecido, pero lo que es claro es que la manipulación lleva a una situación similar a lo descrito bajo "dividendo de la longevidad". Es decir, los animales mantenidos bajo esta dieta no sólo viven más que sus congéneres alimentados *ad libitum*, sino que además presentan una fisiología más joven en prácticamente todos los parámetros medidos. Es decir, la restricción calórica parecería enlentecer el proceso mismo de envejecimiento, de modo que los animales bajo restricción sufren los mismos estragos y patologías que los alimentados *ad libitum*, pero el proceso se retarda en varios meses. Aun considerando las promesas de la restricción calórica (aumento sustancial de la vida activa y libre de patologías serias), es muy poco probable que haya un gran número de individuos humanos dispuestos a disminuir su ingesta calórica a tales niveles, y por el resto de la vida. Por ello, es imprescindible esclarecer los mecanismos moleculares del proceso, a fin de identificar posibles blancos terapéuticos donde drogas u otros tratamientos puedan imitar el efecto de la restricción calórica. No hay consenso en cuanto a las vías moleculares involucradas, pero al menos en levaduras, se ha propuesto que parte del mecanismo podría incluir la activación de sirtuinas (deacetilasas dependientes de NADH)<sup>9-11</sup>. Por otro lado, estos resultados han sido criticados por otros autores<sup>12</sup>. La importancia de las sirtuinas radica en el hecho que se han encontrado activadores de las mismas, y al menos en estudios preliminares, se ha demostrado que el tratamiento de ratones con resveratrol (un activador de sirtuinas) lleva a una mejora importante

de la fisiopatología de ratones alimentados con una dieta rica en grasa<sup>13</sup>. Este mismo trabajo demostró que los animales obesos tratados con resveratrol tienen un aumento de la vida media (la longevidad máxima no ha sido reportada aún). No es claro si en estos experimentos el resveratrol efectivamente ha actuado a través de sirtuinas, y aún queda mucho trabajo por delante para esclarecer si el resveratrol u otros activadores de sirtuinas son efectivamente miméticos de la restricción calórica.

Además de la restricción calórica, hay otras vías de estudio en la que el uso de modelos animales puede ser provechoso. Una de ellas es la biología comparada. Interesantemente, el proceso de envejecimiento ocurre de manera similar en muchas especies. Por ejemplo, la opacidad del cristalino y el adelgazamiento de la piel ocurren consistentemente en humanos de 70-80 años, así como en ratones de 2-2,5 años. El fenómeno parece ser el mismo, pero ocurre bajo el control de un reloj diferente, y es posible que los mecanismos moleculares sean los mismos o al menos bastante similares. Los *Heterocephalus glaber* (*naked mole rats*) y los murciélagos son mamíferos de tamaño y fisiología similares a los ratones, y sin embargo, tienen una longevidad cercana a los 40 años, más de 10 veces la longevidad de un ratón de laboratorio<sup>14,15</sup>. El mecanismo que usan para mantener esa longevidad es actualmente desconocido. Hay muchos casos similares en los que el estudio de biología comparada podría dar luces importantes sobre el envejecimiento. Mientras estos modelos podrían ser informativos a nivel fisiológico e incluso celular, se han logrado grandes avances en el conocimiento del proceso de envejecimiento mediante estudios. Para ello, el ensayo biótico preferente ha consistido en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y levaduras. Utilizando estos modelos de vida media corta y genética bien establecida, se ha identificado al menos una centena de genes que cuando son mutados, alargan la vida, en muchos casos con mantención de la vitalidad fisiológica<sup>16-19</sup>. Uno de ellos es Sir-2, el gen de levaduras que originó el nombre de la familia llamada sirtuinas, que hemos mencionado anteriormente<sup>9</sup>. Sin duda, la vía genética mejor caracterizada respecto a su efecto en el envejecimiento es la vía de IGF. Es así como se ha encontrado que mutaciones en gran parte de los genes que median la transducción de señales a partir de IGF llevan consigo un aumento de la longevidad (media y máxima)<sup>20-22</sup>. Estos resultados han sido

confirmados en ratones, aunque aún no ha sido esclarecido si el efecto es realmente a través de IGF, o a través de insulina<sup>23-25</sup>. Del mismo modo, los tejidos blanco no son conocidos actualmente. Manipulación de la vía Tor también afecta la velocidad de envejecimiento<sup>26-29</sup>, lo que sugiere una relación con la habilidad de detectar nutrientes, y por tanto con la restricción calórica. Otros genes que parecen jugar un rol son *Eat* (mutaciones que afectan la capacidad de ingestión en *C. elegans*)<sup>30,31</sup>, *Indy* (un transportador de ácidos dicarboxílicos)<sup>32</sup>, *Methuselah* (un receptor asociado a proteínas G cuyo ligando, Sun, es una subunidad de la ATPasa F1)<sup>33</sup>, *p66Shc*<sup>34</sup> y *GPC-1*<sup>35</sup>, por nombrar solo algunos.

Como una nota editorial, cabe destacar que todos estos estudios genéticos han sido llevados a cabo en animales constituidos preferencialmente por células post-mitóticas. Es posible que el envejecimiento en tejidos mitóticos ocurra a través de mecanismos genético-moleculares muy diferentes.

#### POSIBLES MECANISMOS PARA EXPLICAR EL ENVEJECIMIENTO

A través de los años, se han propuesto muchísimas teorías que podrían explicar el fenómeno del envejecimiento. Solo aquellas más en boga serán brevemente discutidas aquí.

**1. Teoría de radicales libres.** Sin lugar a dudas la teoría más aceptada, fue propuesta por Harman en 1956<sup>36</sup>. La teoría es simple, y estipula que el envejecimiento ocurre como consecuencia del daño acumulativo producido por los radicales libres que se liberan como resultado de la respiración. Hay una extensa literatura que sugiere la validez de dicha teoría, y efectivamente se ha visto en una variedad de modelos animales, que el tratamiento con antioxidantes es beneficioso para la salud del animal, o el desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento<sup>37,38</sup>. Por otro lado, estudios genéticos no han sido concluyentes, y principalmente negativos respecto a un efecto sobre la longevidad misma. Trabajos iniciales por Sohal y cols<sup>39</sup> mostraron que en *Drosophila*, la sobreexpresión de superóxido dismutasa más catalasa lleva a un aumento en la longevidad. Estos estudios han sido difíciles de repetir, incluso por el mismo grupo que los publicó inicialmente. Más recientemente, se vio que la introducción de catalasa a la mitocondria tiene también un efecto similar<sup>40</sup>,

pero nuevamente, los resultados no han sido reproducibles. Se podría aducir que el mecanismo de defensa contra radicales libres es tan eficiente, que es difícil de mejorar en el laboratorio. De hecho, se ha calculado que más de 99,9% de los radicales libres producidos son efectivamente neutralizados por sistemas enzimáticos muy sofisticados. En base a dichos argumentos, el laboratorio del Dr. A. Richardson ha producido una serie de animales con modificaciones *knock-out* en varios genes protectores (superóxido dismutasas, catalasa, tioredoxinas, y combinaciones de los mismos). En todos los casos, se ha observado un notable aumento en el daño por radicales libres, sobre varias macromoléculas. Sin embargo, la longevidad no se ha visto afectada en ninguno de dichos modelos<sup>41,42</sup>. En resumen, una nota de cuidado: los radicales libres parecen jugar un rol importante en la patología y fisiología del individuo anciano. Sin embargo, ellos no parecen jugar un rol en el envejecimiento en sí, ya que con algunas excepciones, su manipulación en general no lleva a cambios en la vida media o máxima. Por otro lado, todos los estudios descritos han sido llevados a cabo bajo condiciones muy controladas, donde los animales no han sido estresados en ningún momento, una situación radicalmente distinta a la vida real en humanos.

**2. Senescencia celular, telómeros.** En los años '60, L. Hayflick observó que las células de mamífero tenían una longevidad limitada, lo que lo llevó a proponer que ese fenómeno representaba el envejecimiento a nivel celular<sup>43-45</sup>. Específicamente, el fenómeno observado por Hayflick es que las células en cultivo se pueden multiplicar un número fijo de veces (60-70 en humanos, 8-10 en ratones), y luego de eso se mantenían vivas, pero eran incapaces de proliferar nuevamente. Ahora sabemos que este llamado "fenómeno de Hayflick" o "senescencia celular" ocurre como resultado del acortamiento gradual de los telómeros, que ocurre cada vez que una célula se divide. Por mucho tiempo se debatió si este fenómeno ocurriría *in vivo*, pero S. Lowe<sup>46,47</sup> y otros han demostrado que el acortamiento de telómeros no es el único mecanismo por el cual una célula puede adquirir el fenotipo senescente. De hecho, muchos estímulos tales como los radicales libres anteriormente discutidos<sup>48</sup>, o la activación inoportuna de oncogenes<sup>49</sup>, o el tratamiento con quimioterapia<sup>50</sup>, todos llevan a un fenotipo indistinguible del descrito por Hayflick. Estudios en monos han demostrado

que la senescencia celular es un fenómeno bastante generalizado en animales viejos (hasta 15%-20% de las células de la dermis han demostrado un fenotipo senescente)<sup>51,52</sup>, y de hecho, actualmente se considera que la senescencia celular, activada por p53 o pRB, es un mecanismo antitumoral a la par con la apoptosis. Sin embargo, al igual que los radicales libres, el rol de este fenómeno en el envejecimiento del individuo aún no ha sido aclarado. Cabe destacar que estudios de J. Campisi han demostrado que las células senescentes, tanto *in vivo* como *in vitro*, secretan una gran cantidad de moléculas bioactivas, y de hecho, son capaces de modular el fenotipo de células adyacentes o cercanas<sup>53</sup>. Desde ese punto de vista, nuevamente nos encontramos con una situación que quizás no afecte la longevidad (los estudios no han sido realizados, por limitaciones tecnológicas), pero muy probablemente afecte la calidad de vida y la patología del adulto mayor.

**3. Células madre y células troncales.** Se ha propuesto que el envejecimiento y el descenso en la capacidad de regeneración y respuesta a estrés, podrían ser debidos a un agotamiento en las células troncales (Figura 1)<sup>54</sup>. Es un tema muy vigente, sobre el cual solamente empezamos a conocer. Muchos tejidos responden a injurias mediante la activación de células troncales locales, tales como las células satelitales del músculo<sup>55</sup>, lo que lleva a la reposición de células dañadas y eliminadas, por ejemplo por apoptosis. Otros tejidos, como el páncreas y el hígado, parecen utilizar un mecanismo diferente, a través del cual células diferenciadas son capaces de desdiferenciarse, proliferar, y re-diferenciarse<sup>56,57</sup>. Aun en otros casos, tejidos como el corazón son capaces de regenerarse luego de un infarto mediante el reclutamiento de células troncales de la médula ósea<sup>58</sup>. Con el envejecimiento, la capacidad regenerativa de diversos tejidos disminuye, y aparentemente, esto ocurre mediante una variedad de mecanismos. En músculo, por ejemplo, el número de células satelitales no disminuye, pero su nicho se encuentra afectado, lo que lleva a una disminución en su capacidad proliferativa y regenerativa<sup>59</sup>. En contraste, las células troncales asociadas al folículo piloso (y que son también activadas en respuesta a daño a la piel) se pierden paulatinamente con la edad<sup>60,61</sup>. En ambos casos, el resultado fisiológico es el mismo

(pérdida funcional), pero el apronte terapéutico a fin de restaurar esa funcionalidad perdida será muy diferente en cada caso, y por ese motivo, mayores estudios mecanísticos son necesarios.

#### CONCLUSIONES

El enorme aumento en expectativa de vida observado en gran parte del mundo en los últimos 100 años se ha debido principalmente al mejor tratamiento de enfermedades infantiles de origen microbiano y a cambios en estilo de vida, higiene y otros factores ambientales. El tratamiento de enfermedades asociadas a la vejez (cardiovasculares, cáncer) está empezando a tener un impacto, y el hecho indiscutible es que las sociedades del siglo XXI serán notablemente más viejas que en cualquier otro momento de la historia de la humanidad. El gran desafío biológico es

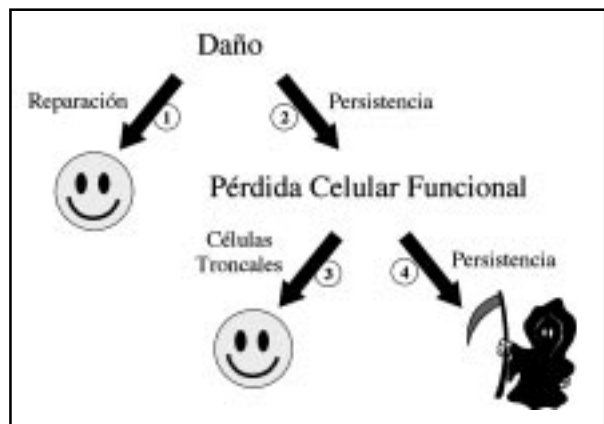


Figura 1. Modelo hipotético del rol de las células troncales y la regeneración en el envejecimiento. Es generalmente aceptado que al menos parte del proceso de envejecimiento se podría deber a daño a macromoléculas, principalmente mediante radicales libres. Sin embargo, el organismo joven tiene mecanismos de defensa y reparación que lo protegen contra ese daño<sup>1</sup>. El problema ocurre cuando se produce un desequilibrio entre la producción de daño y su reparación, llevando a la persistencia del daño<sup>2</sup>, con la concomitante pérdida de funcionalidad celular (sea por senescencia, apoptosis u otro mecanismo). En ese caso el organismo recurre a un "segundo nivel" de protección, mediante la activación de mecanismos de regeneración, incluida la activación de células madre y células troncales<sup>3</sup>. Sin embargo, cuando ese segundo mecanismo se agota, el daño no puede ser reparado, lo que lleva a su persistencia<sup>4</sup>, una mayor pérdida funcional y eventualmente a la muerte del organismo. SHAPE \\* MERGEFORMAT

la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares responsables del deterioro funcional del que padecen los adultos mayores. Es hipotéticamente posible que estudios de modelos como la restricción calórica u otros nos llevarán en un futuro cercano a una situación en que los humanos y otras especies seleccionadas (¿por quién?) podrán gozar de algo como el “dividendo de la longevidad”, donde un retardo significativo del proceso básico de envejecimiento se podría traducir en un retraso en el desarrollo de los achaques propios de la vejez. A nivel del individuo, ésta es una meta interesante y deseable. Sin embargo, a nivel de sociedad, ya hemos visto que el aumento en longevidad nos ha llevado a

un estrés significativo de los sistemas de seguros y pensiones, así como a la dinámica del campo laboral. Aumentos aún mayores pueden llevar a un colapso total del sistema social y económico, y por ello es crucial que la discusión social y económica vaya a la par de los enormes avances en nuestra comprensión de la biología del envejecimiento. Vivimos en un mundo en que los avances de las ciencias básicas son exhilarantes, y la biología del envejecimiento no ha sido ajena. Queda por resolver el cómo traducir estos avances en un mejoramiento de la calidad de vida del adulto mayor, sin olvidar que el aumento de longevidad requiere una reestructuración de la sociedad que sustente esos años adicionales.

#### REFERENCIAS

- MINIÑO AM, HERON MP, MURPHY SL, KOCHANKEK KD. Deaths: Final Data for 2004. *National Vital Statistics Reports* 2007; 55 (19).
- OEPPEEN J, VAUPEL JW. Demography: Broken Limits to Life Expectancy. *Science* 2002; 296: 1029-1031.
- KINSELLA K, GIST Y. *Older workers, retirement, and pensions. A comparative international chartbook*. Washington, DC: U.S. Census Bureau and U.S. National Institute on Aging. 1995.
- OLSHANSKY J, CARNES BA, CASSEL C. In search of Methuselah: estimating the upper limits to human longevity. *Science* 1990; 250: 634-40.
- OLSHANSKY SJ, PERRY D, MILLER RA, BUTLER RN. Pursuing the longevity dividend: scientific goals for an aging world. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1114: 11-3.
- MASORO EJ. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 913-22.
- MCCAY CM, CROWELL MF, MAYNARD LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutrition* 1935; 10: 63-79.
- HARPER JM, LEATHERS CW, AUSTAD SN. Does caloric restriction extend life in wild mice? *Aging Cell* 2006; 6: 441-9.
- HEKIMI S, GUARENTE L. Genetics and the specificity of the aging process. *Science* 2003; 299: 1351-4.
- DALI-YOUCF N, LAGOUGE M, FROELICH S, KOEHL C, SCHOONJANS K, AUWERX J. Sirtuins: the ‘magnificent seven’, function, metabolism and longevity. *Ann Med* 2007; 39: 335-45.
- BORDONE L, GUARENTE L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 298-305.
- TSUCHIYA M, DANG N, KERR EO, HU D, STEFFEN KK, OAKES JA ET AL. Sirtuin-independent effects of nicotinamide on lifespan extension from calorie restriction in yeast. *Aging Cell* 2006; 6: 505-14.
- BAUR JA, PEARSON KJ, PRICE NL, JAMIESON HA, LERIN C, KAIRA A ET AL. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 444: 337-42.
- PODLUTSKY AJ, KHRITANKOV AM, OVODOV ND, AUSTAD SN. A new field record for bat longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 1366-8.
- BUFFENSTEIN R. The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 1369-77.
- HOUTHOOFD K, VANXETEREN JR. Public and private mechanisms of life extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Genet Genomics* 2007; 277: 601-17.
- KENYON C, CHANG J, GENSCH E, RUDNER A, TABTIANG R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993; 366: 461-4.
- LIN K, DORMAN JB, RODAN A, KENYON C. *daf-16*: an HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997; 278: 1319-22.
- FRIEDMAN DB, JOHNSON TE. A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 1988a; 118: 75-86.
- SNEEL GD. Dwarf a new Mendelian recessive character of the house mouse. *Proc Natl Acad. Sci U.S.A* 1929; 15: 733-4.
- KENYON C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 2005; 120: 449-60.
- BROWN-BORG HM, BORG KE, MELISKA CJ, BARTKE A. Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 1996; 384: 433.
- ZHOU Y, XU BC, MAHESHWARI HG, HE L, REED M, LOZYKOWSKI ET AL. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/ binding protein gene (The Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1997; 94: 13215-20.
- COSCHIGANO KT, HOLLAND AN, RIDERS ME, LIST EO, FLYVBJERG A, KOPCHICK JJ. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology* 2003; 144: 3799-810.
- HOLZENBERGER M, DUPONT J, DUCOS B, LENEUVE P, GELOEN A, EVEN PC ET AL. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 2003; 421: 182-7.

26. KAPAH P, ZID BM, HARPER T, KOSLOVER D, SAPIN V, BENZER S. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol* 2004; 14: 885-90.
27. KAEBERLEIN M, POWERS RW, STEFFEN KK, WESTMAN EA, HU D ET AL. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 2005; 310: 1193-6.
28. JIA K, CHEN D, RIDDLE DL. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* 2004; 131: 3897-906.
29. VELLAI T, TAKACS-VELLAI K, ZHANG Y, KOVACS AL, OROSZ L, MULLER F. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 2003; 426: 620.
30. FRIEDMAN DB, JOHNSON TE. Three mutants that extend both mean and maximum life span of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, define the *age-1* gene. *J Gerontol* 1988b; 43: B102-B109.
31. LAKOWSKI B, HEKIMI S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13091-6.
32. ROGINA B, REENAN RA, NILSEN SP, HELFAND SL. Extended Life-Span Conferred by Cotransporter Gene Mutations in *Drosophila*. *Science* 2000; 290: 2137-40.
33. LIN YJ, SEROUDE L, BENZER S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*. *Science* 1998; 282: 943-6.
34. MIGLIACCIO E, GIORGIO MM, PELICCI G, REBOLDI P, PANDOLFI PP, LANFRANCONE L ET AL. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 1999; 402: 309-13.
35. DILOVA I, EASLON E, LIN SJ. Calorie restriction and the nutrient sensing signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 752-67.
36. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
37. CROSS CE, HALLIWELL B, BORISH ET, PRYOR WA, AMES BN, SAUL RL ET AL. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-45.
38. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM, CROSS CE. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598-620.
39. SOHAL RS, AGARWAL A, AGARWAL S, ORR WC. Simultaneous overexpression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 1995; 270: 15671-4.
40. SCHRINER SE, LINFORD NJ, MARTIN GM, TREUTING P, OGBURN CE, EMOND M ET AL. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 2005; 308: 1909-11.
41. VAN REMMEN H, IKENO Y, HAMILTON M, PAHLAVANI M, WOLF N, THORPE SR ET AL. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* 2003; 16: 29-37.
42. MULLER FL, LUSTGARTEN MS, JANG Y, RICHARDSON A, VAN REMMEN H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 477-503.
43. HAYFLICK L. The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation. *Exp Cell Res* 1961; 23: 14-20.
44. HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25:585-621.
45. HAYFLICK L. Human cells and aging. *Sci Am* 1968; 218: 32-7.
46. FERBEYRE G, DE STANCHINA E, LIN AW, QUERIDO E, MCCURRACH ME, HANNON GJ ET AL. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 3497-508.
47. LIN AW, BARRADAS M, STONE JC, VAN AELST L, SERRANO M, LOWE SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998; 12: 3008-19.
48. SOHAL RS, WEINDRUCH R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; 273: 59-63.
49. SERRANO M, LIN AW, MCCURRACH ME, BEACH D, LOWE SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88: 593-602.
50. SHAY JW, RONINSON IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 2004; 23: 2919-33.
51. HERBIG U, FERREIRA M, CONDEL L, CAREY D, SEDIVY JM. Cellular senescence in aging primates. *Science* 2006; 311: 1257.
52. JEYAPALAN JC, FERREIRA M, SEDIVY JM, HERBIG U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* 2007; 128: 36-44.
53. CAMPISI J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005; 120: 513-22.
54. RUZANKINA Y, BROWN EJ. Relationships between stem cell exhaustion, tumour suppression and ageing. *Br J Cancer* 2007; 97: 1189-93.
55. CHARGE SB, RUDNICKI MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84: 209-238.
56. DOR Y, BROWN J, MARTÍNEZ OI, MELTON DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 2004; 429: 41-6.
57. STANGER BZ, TANAKA AJ, MELTON DA. Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature* 2007; 445: 886-91.
58. LAFLAMME MA, MURRY CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 845-58.
59. BRACK AS, RANDO TA. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev* 2007; 3: 226-37.
60. TRÜBE RM. Aging of hair. *J Cosmet Dermatol* 2005; 4: 60-72.
61. SARIN KY, ARTANDI SE. Aging, graying and loss of melanocyte stem cells. *Stem Cell Rev* 2007; 3: 212-7.