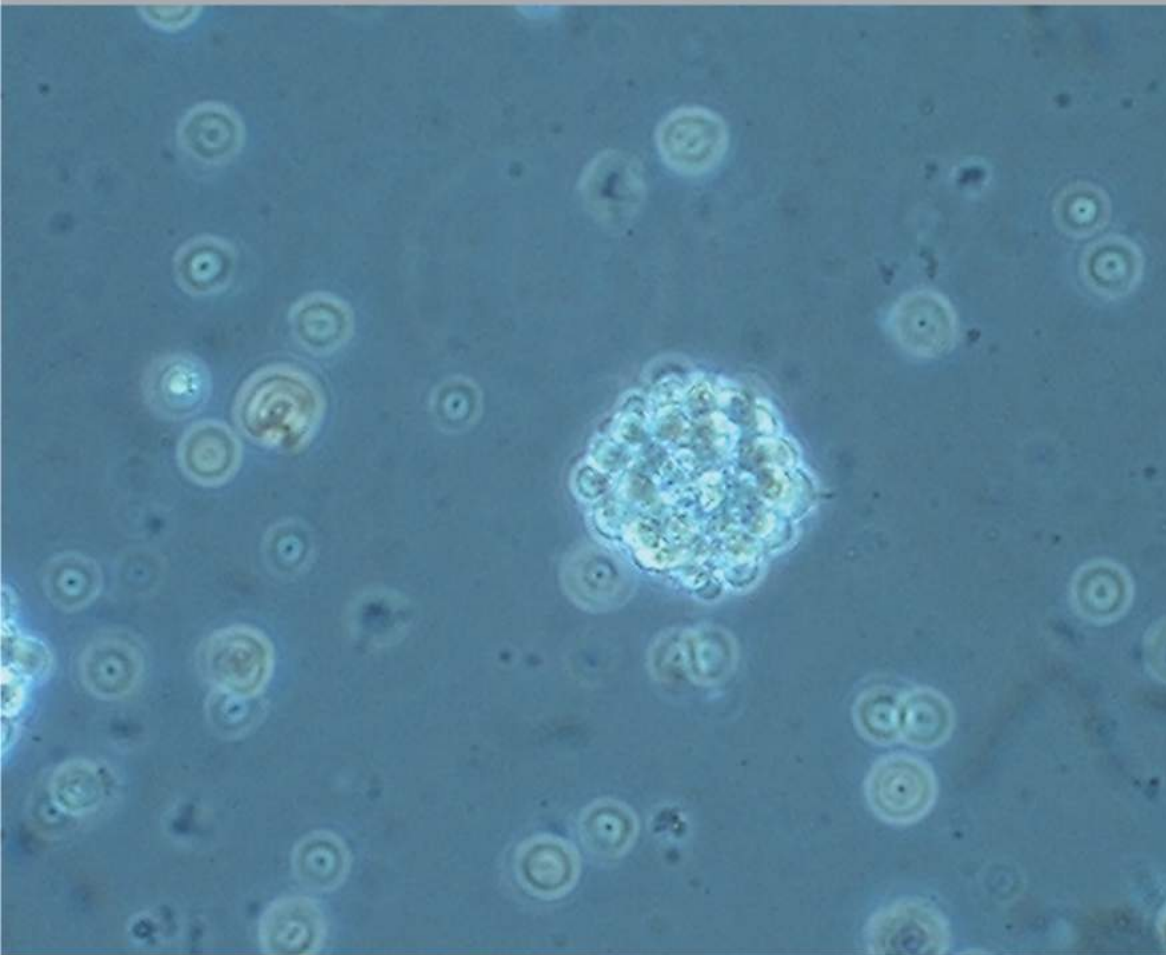




# ASPECTOS MOLECULARES DEL ENVEJECIMIENTO

SALUD



Instituto de  
Geriátria



Red Temática  
Envejecimiento,  
Salud y Desarrollo Social



# **ASPECTOS MOLECULARES DEL ENVEJECIMIENTO**

## ASPECTOS MOLECULARES DEL ENVEJECIMIENTO

1ª. edición, México, 2012

SECRETARÍA DE SALUD

© 2012 INSTITUTO DE GERIATRÍA

ISBN 978-607-460-281-4

Coordinadoras de obra:

Eunice López Muñoz, Nora M. Torres Carrillo

Coordinación editorial:

Nora M. Torres Carrillo

Corrección de estilo:

Lilia Sandra Luna Pérez

Diseño:

Héctor Efrén Lara Dávila

Este material puede ser copiado, reproducido, modificado y distribuido por cualquier medio físico o electrónico, sólo sujeto a los términos y condiciones establecidos en la Open Publication License, v. 1.0 o posterior (<http://www.opencontent.org/openpub/>). Está prohibida la distribución de versiones sustantivamente modificadas de este documento sin la autorización explícita de los propietarios de los derechos. La distribución del trabajo o derivados de éste en cualquier libro estándar (impreso) está prohibida a menos que se obtenga con anticipación el permiso de los propietarios de los derechos. Los derechos comerciales siguen siendo propiedad del autor.

Favor de citar de la siguiente manera:

López Muñoz E y Torres Carrillo NM (coords.) (2012). *Aspectos moleculares del envejecimiento*. México: Instituto de Geriatria.

Instituto de Geriatria.

Periférico Sur 2767, Col. San Jerónimo Lídice,  
Del. Magdalena Contreras, México, D.F. C.P. 10200  
[www.geriatria.salud.gob.mx](http://www.geriatria.salud.gob.mx)

Impreso en México/Printed in Mexico

# **ASPECTOS MOLECULARES DEL ENVEJECIMIENTO**

**Eunice López Muñoz**  
**Nora M. Torres Carrillo**  
coordinadoras

**México, 2012**

**SALUD**



Instituto de  
Geriátría



**Salomón Chertorivski Woldenberg**

*Secretario de Salud*

**Germán Fajardo Dolci**

*Subsecretario de Integración y Desarrollo del Sector Salud*

**Pablo Kuri Morales**

*Subsecretario de Prevención y Promoción de la Salud*

**Laura Martínez Ampudia**

*Subsecretaria de Administración y Finanzas*

**David García-Junco Machado**

*Comisionado Nacional de Protección Social en Salud*

**Mikel Andoni Arriola Peñalosa**

*Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios*

**Romeo Sergio Rodríguez Suárez**

*Titular de la Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad*

**Miguel Limón García**

*Titular de la Unidad Coordinadora de Vinculación y Participación Social*

**Francisco Caballero García**

*Titular de Análisis Económico*

**Guillermo Govela Martínez**

*Coordinación General de Asuntos Jurídicos y Derechos Humanos*

**Carlos Olmos Tomasini**

*Director General de Comunicación Social*

**Dr. Luis Miguel Gutiérrez Robledo**

*Director General del Instituto de Geriátría*

**Dr. J. Héctor Gutiérrez Ávila**

*Director de Investigación*

**Dra. Flor Ma. de Guadalupe Ávila Fematt**

*Directora de Enseñanza y Divulgación*

<b>Prólogo</b>	7
<b>Medicina antienvjecimiento</b> Agustín Lugo Radillo	9
<b>Metodología de la investigación biomédica en materia de envejecimiento</b> Eunice López Muñoz Judith Villa Morales	19
<b>Síndromes progeroides como modelo de estudio del proceso de envejecimiento</b> Eunice López Muñoz	31
<b>Manifestaciones del envejecimiento a nivel citogenético</b> Ana Claudia Velázquez Wong	41
<b>Aplicación de la genómica y la proteómica en el estudio de las bases moleculares del envejecimiento</b> Argelia E. Rojas Mayorquín Verónica Palomera Ávalos Ana Laura Márquez Aguirre Daniel Ortuño Sahagún	49
<b>Regulación epigenética del envejecimiento</b> Ingrid Fetter Pruneda Leonora Olivos Cisneros Gabriel Gutiérrez Ospina Shaday Michán	61
<b>Mitocondria y envejecimiento</b> Mina Konigsberg	71
<b>Daño oxidativo, sistemas de defensa y reparación del DNA en el envejecimiento</b> Armando Luna López	81
<b>Mecanismos de degradación de proteínas en el envejecimiento</b> Viviana Pérez I. Mina Konigsberg	89
<b>La autofagia en el proceso de envejecimiento</b> Susana Castro	101
<b>Participación de la reactivación del ciclo celular en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer</b> Karina Hernández Ortega Clorinda Arias Ricardo Quiroz Baez	111

<b>Enfermedad de Alzheimer</b>	125
Perla Moreno Castilla	
Luis Bernardo Tovar y Romo	
<b>Enfermedad de Parkinson</b>	139
Perla Moreno Castilla	
Luis Bernardo Tovar y Romo	
<b>Mecanismos de envejecimiento cardiovascular</b>	147
María del Carmen Palacios Reyes	
<b>Mecanismos de envejecimiento músculo-esquelético, sarcopenia</b>	161
Carmen Ríos	
<b>Entre la Escila del cáncer y la Caribdis del envejecimiento</b>	173
Jesús Aguirre Hernández	
<b>ANEXO</b>	
<b>Informática para el estudio del envejecimiento</b>	183
Layla Michán	
Claudia Itzel Pedraza	
Israel Muñoz Velasco	



El envejecimiento se manifiesta como un declive funcional asociado a múltiples cambios sistémicos a lo largo de la vida. El inicio y el ritmo de este declive presenta variaciones significativas en los diferentes órganos de un individuo; estas variaciones se presentan también entre los individuos y entre las poblaciones. Los hallazgos científicos coinciden en que el envejecimiento es un fenómeno multifactorial que involucra a los diferentes niveles de organización biológica (genes, células, tejidos, sistemas y el organismo como una unidad funcional). Este proceso conduce paulatinamente a la fragilidad y la disfunción en la edad avanzada, que eventualmente se manifiesta en el desarrollo de numerosas patologías degenerativas. Sin embargo, observaciones científicas indican que el envejecimiento es un proceso modulado por diferentes mecanismos moleculares, tal como se observa en nematodos que, gracias a una mutación aislada, alcanzan una longevidad funcional mayor que el resto de los individuos de su misma especie.

A lo largo de varias décadas hubo escaso interés en el campo de la biología molecular por el estudio de los mecanismos de regulación del envejecimiento, pues se consideraba que éste era un proceso pasivo y entrópico de deterioro orgánico. Los hallazgos científicos han mostrado, sin embargo, que se trata de un proceso biológico, sujeto a regulación por las vías de señalización y factores de transcripción. Muchas de estas vías fueron primero descubiertas en organismos de vida corta como las levaduras, los gusanos y las moscas, y algunas de ellas están implicadas en la longevidad de los mamíferos. Actualmente se acepta que la interferencia de ciertas vías de señalización y la modulación del aporte nutricional pueden extender la longevidad de una variedad de organismos tan diversos como levaduras, gusanos, moscas y ratas.

Aunque se conocen algunas de estas vías y su regulación por factores genéticos y epigenéticos, persisten muchas interrogantes. Por ello, la comprensión de las bases celulares y moleculares del proceso de envejecimiento se ha convertido en un objetivo relevante entre los profesionales que se dedican a la investigación básica. El avance en este campo de la investigación tiene numerosas implicaciones para un mundo que envejece.

El porcentaje de la población de adultos mayores crece con mayor rapidez que el resto de los otros grupos etarios, de manera que el disfrutar una vejez sana y activa se ha convertido en una prioridad global. En este contexto, la investigación en torno a la biología del envejecimiento está logrando un desarrollo significativo, como se demuestra en los capítulos que integran este texto, lo cual genera expectativas de que en el futuro se podrá contender de manera efectiva con diversas enfermedades asociadas con la edad a través de la modulación del proceso de envejecimiento.

Este libro se integra a otras obras promovidas por el Instituto de Geriátrica relativas al vasto campo de la investigación sobre el envejecimiento y se enfoca a los aspectos moleculares de este proceso desde una perspectiva integradora, destacando los avances más recientes y sus implicaciones futuras para la investigación básica. Los 16 capítulos de esta obra describen de manera concisa las características más relevantes acerca de los mecanismos moleculares del envejecimiento destacando su relación con la etiología de las enfermedades crónicas, como son los trastornos neurodegenerativos, enfermedad cardiovascular y sarcopenia. Cabe destacar que los autores cuentan con una amplia experiencia y reconocimiento en sus áreas de investigación; sus contribuciones analizan de manera accesible los temas relacionados con aspectos moleculares sustantivos del envejecimiento. En suma, la información aquí vertida será de valioso apoyo para los profesionales de la salud dedicados al cuidado de los pacientes, a los investigadores del área epidemiológica y social, así como a estudiantes de las ciencias de la salud.

Dr. Luis Miguel F. Gutiérrez Robledo  
Director General

Dr. J. Héctor Gutiérrez Ávila  
Director de Investigación



**Agustín Lugo Radillo**

Departamento de Investigación Básica,

Instituto de Geriátria.

alugor@hotmail.com

a búsqueda del incremento de la longevidad ha estado presente en la mente del hombre desde que éste tiene conciencia, como ha quedado de manifiesto en las diferentes culturas que han existido a lo largo de la historia. Ante la imposibilidad de incrementar grandemente la longevidad mediante el uso de la medicina tradicional –y al seguir siendo presa de las infecciones y factores ambientales–, las sociedades precontemporáneas se concentraban en el campo espiritual para tratar de extender su existencia posterior a la muerte, la cual se consideraba una transición hacia una nueva etapa. Para algunas de esas civilizaciones precontemporáneas sumamente desarrolladas –como la azteca, la maya y las culturas del altiplano y el occidente mexicano–, la muerte era un umbral a través del cual se pasaba a una vida eterna. Hacia el año 1000 a.C., para buscar tal prolongación existencial, los mayas recurrían al psicoducto, que conectaba su tumba con el exterior y las generaciones subsecuentes. Esto se complementaba, al igual que en las culturas del centro y occidente de México, con rituales y arreglos funerarios que incluían objetos y animales que servirían y acompañarían, respectivamente, al espíritu del difunto a lo largo de su viaje hacia otra etapa existencial. El tipo de vida que se tendría después de fallecer dependía de la forma en que sucedía la muerte, de los rituales realizados antes del deceso y de las ofrendas colocadas en la tumba, especialmente la presencia de un perro o lobo que guiara a las almas hacia el inframundo (Cabada-Izquierdo, 1992; Fields, 2005; Graulich, 2011).

A su vez, los egipcios (3150 a.C.) y los incas (siglo XII d.C.) concentraban su atención en la preservación del cuerpo después de morir, pues creían que era importante conservar la integridad física para tener vida después de la muerte. Los incas, en particular, creían que después de la vida existía una etapa similar a la actual en otro plano. Muchas veces, si el difunto era miembro de la nobleza, se sacrificaba a sus sirvientes y concubinas para que lo acompañaran y atendieran en la otra vida (Age-Retardation, 2011; Aufderheide, 2003; London, 2011).

En Asia, la búsqueda se centró más en la extensión de la vida en el plano físico que en el espiritual. En esta cruzada, la unión de la mitología y la astrología con

conocimientos empíricos dio origen a la alquimia, una protociencia que echó raíces desde 2500 a.C. La alquimia tenía por objetivos principales conseguir el elixir de la vida y transformar metales en oro. El elixir de la vida era una poción que supuestamente prolongaría la existencia de quien la consumiese, pero también era capaz de crear y devolver la vida. Fue buscado por diversas civilizaciones con resultados negativos y cada cultura le dio distinto nombre por ejemplo, *amrit* en India y panacea o ambrosía en Grecia. Los chinos también creían que el consumo de jade, cinabrio, hematita u oro, o de pociones con sulfuro, mercurio y arsénico podían alargar la longevidad. Sin embargo, dichos elixires a menudo eran tóxicos y contribuyeron, aparentemente, a la muerte de diversos gobernantes chinos, como el primer emperador de la China unificada (221 a.C.), Qin Shi Huang, quien murió a causa de las píldoras de mercurio que le prescribían sus médicos.

La búsqueda del elixir continuó en el Medioevo y se extendió hasta siglos después. Nuevas sustancias que, se aseguraba, tenían la propiedad de alargar la vida surgieron a través del tiempo. En el siglo VIII a.C., Herodoto hablaba en Grecia de un agua que devolvía la salud y la vida. Juan Ponce de León emprendió en 1513 una expedición a Florida en busca de dicha agua, la cual, por supuesto, nunca encontró. La creencia en la alquimia no se limitaba a ciertos sectores de la sociedad; científicos tan notables como Roger Boyle (siglo XVII) e Isaac Newton (siglo XVIII) también la incluyeron en sus actividades. El alquimismo terminó por ceder ante el avance de la ciencia. La búsqueda intensa de la mera extensión de la vida se diluyó y perdió fuerza al considerarse un evento imposible y fantasioso. Sin embargo, el deseo ha persistido de manera implícita en la mayoría de las religiones, las cuales, si bien aceptan la terminación de la vida física, proclaman la inmortalidad del individuo en su alma. Algunas religiones incluso hablan de un retorno casi inmediato al plano físico a través de la reencarnación del individuo (Chey, 2006; Gomara, 1954; Hannabuss, 2003; Peck, 2000; Principe, 1998; Westfall, 1983; Wright, 2001).



Figura 1. Símbolos de vida eterna en distintas culturas. La longevidad y la vida eterna están presentes como idea común en el simbolismo de distintas civilizaciones geográficamente aisladas entre sí. a) Anj, el jeroglífico egipcio que simboliza vida eterna. b) El jade era símbolo de eternidad para los olmecas, zapotecas y mayas. Los olmecas lo colocaban en la lengua de sus muertos como símbolo de existencia continua. c) El ave fénix es un animal mitológico presente en las culturas egipcia, siria, persa y romana como símbolo de inmortalidad (Gordon, 2004; Grube, 2006; Herodotus, 1998).

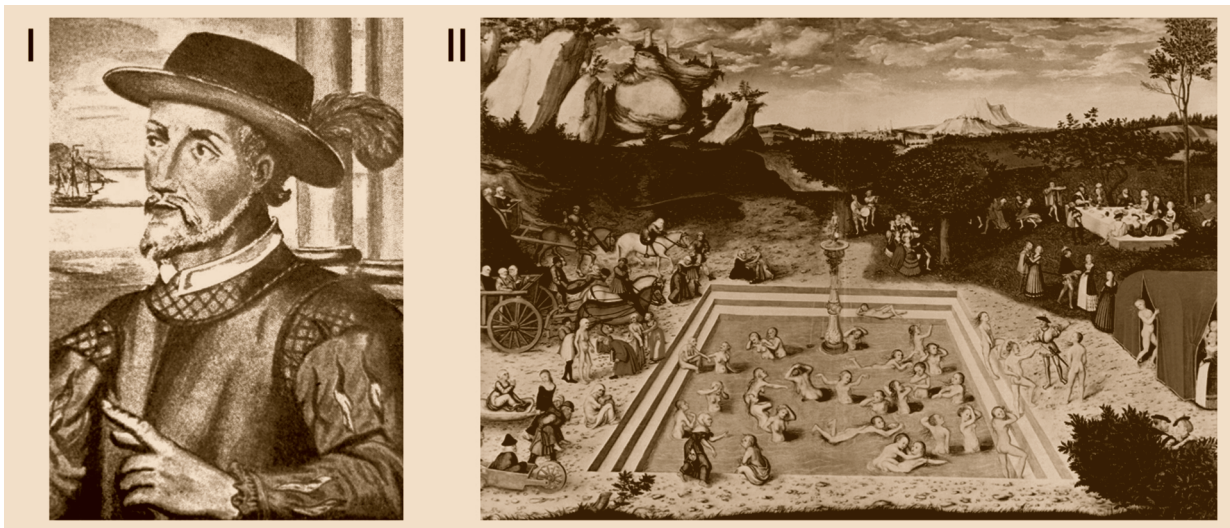


Figura 2. La fuente de la eterna juventud. La creencia en la existencia de aguas que curaban y devolvían la vida era moneda común en Oriente Medio y Grecia, posteriormente aceptada en el resto de Europa. I) Juan Ponce de León lideró una expedición a Florida en busca de esas aguas. II) La fuente de la juventud, pintura de Lucas Cranach (1546 d.C).

### Medicina antienviejecimiento contemporánea

En la segunda parte del siglo XX, los científicos comenzaron a formular sólidas teorías evolutivas y moleculares acerca de los mecanismos y causas del envejecimiento. La expansión de la vida mediante la restricción calórica, observada primeramente en roedores, cobró auge pero decayó rápidamente en popularidad y momento debido a complicaciones psicológicas transitorias observadas en

los sujetos a prueba y a la difícil exigencia de sujetarse a un bajo consumo de calorías. En Biósfera 2 –experimento que consistía en crear en Arizona un hábitat cerrado autosustentable destinado a desarrollar un sistema de colonización en otros planetas–, la inquietud y hambre persistente de los ocupantes estuvieron entre los factores que causaron el fracaso del proyecto. La mayoría de la comunidad científica ahora persigue la extensión de la vida

principalmente como un resultado indirecto o secundario al tratamiento y cura de las enfermedades y cambios patológicos asociados al envejecimiento. Es decir, cuando logremos manipular dichos padecimientos, estaremos en condiciones de vivir más y con mayor calidad (CR Society, 2011; Weindruch, 1988).

### **Razones del extensionismo**

La aspiración de vivir por mayor tiempo no transgrede las leyes naturales, de acuerdo con la evidencia científica con la que se cuenta en la actualidad, la cual indica que el envejecimiento no es un evento genéticamente programado, sino una consecuencia del “abandono” de los procesos de selección natural una vez que la reproducción se ha llevado a cabo. Envejecer es un proceso biológico común y, por lo tanto, normal. Sin embargo, también es el resultado de un daño molecular agregado y progresivo que terminará por comprometer los mecanismos fisiológicos y, finalmente, generará la muerte. Al contrario de lo que se creía en el pasado, hoy sabemos que nadie muere de envejecimiento puro, incluso en organismos longevos siempre se encuentra un órgano con una patología aguda desencadenante de la muerte. Desde el punto de vista de la medicina biogerontológica, este daño acumulado debe ser reparado.

### **Bioética de la extensión de la vida**

La extensión de la vida es un tema polémico en el que la ciencia, la bioética, la religión y la moral tienen opiniones encontradas. Algunos expertos en bioética no concuerdan con la idea de que la extensión de la vida es un fin noble. Lo consideran contra natura y egoísta, pues en su opinión la muerte es un don que le da sentido a la vida en el ámbito personal al hacer consciente al individuo de su existencia limitada. Argumentan que sin la muerte la sociedad detendría su progreso al decrecer la motivación individual. Por otra parte, la mayoría de dichos expertos está de acuerdo con incrementar la vida de los individuos, pero también enuncian las potenciales consecuencias sociales, económicas y de supervivencia de la propia especie. El deseo de extender la existencia sin un objetivo médico es considerado por ellos un concepto egoísta e inmoral, pero cuando la justificación de esta extensión se basa en el hecho de que al conocer, controlar y/o modular los mecanismos moleculares que producen –o se suscitan en– el envejecimiento se posibilitará la cura de las enfermedades asociadas y la disminución del sufrimiento

intrínseco, esta causa cobra una dimensión éticamente positiva y de beneficio social y económico claro. La inmortalidad es un evento imposible, por lo que la muerte siempre será la compañera de la existencia humana, pero sin el sufrimiento o desgaste físico como antesala.

Las consecuencias de una extensión de la vida darían pie a cambios sociales profundos. Por ejemplo, en las dinámicas familiares, al requerir que los individuos jóvenes empleen más tiempo en cuidar a los adultos mayores. Por otra parte, si bien las enfermedades tendrían un menor peso sobre los sistemas de salud, con el consecuente ahorro enorme en este rubro, habría un gasto inmenso en el sistema de pensiones. La economía y la industria deberán buscar alternativas para llenar el espacio que una población joven cada vez más reducida deja en los sistemas de producción. Si las predicciones fallan y las tasas de natalidad no disminuyen, el incremento desmedido de la población en general y de la población senil en particular serán catastróficos para toda la humanidad. Asimismo, nuestra especie sufrirá cambios que dependerán de la edad en la que los humanos se reproduzcan, de si su estructura genética se mantiene o no libre de mutaciones acumuladas o cambios epigenéticos severos y de si su menopausia se modifica o desaparece. Otro gran problema estriba en determinar cómo asegurar el libre acceso a la terapia de extensión de vida cuando ésta se presente en un mundo dominado por corporaciones comerciales. Así como los medicamentos tienen un precio que limita su acceso a la población global, el reto será distribuir homogéneamente dichas estrategias terapéuticas para evitar la generación de dos clases de individuos: aquellos con una esperanza de vida reducida y otros cuya existencia será más prolongada y con mayor calidad.

Aunque por el momento estas ideas se vinculen a la ciencia ficción, la revolución en el campo de la biología molecular ha hecho que los primeros avances científicamente serios ya se hayan dado y que su conclusión exitosa sea virtualmente inevitable. No sabemos cuándo, pero será posible (Museo de Sitio Manuel Chávez Ballón, 2011; Davis, 2004; Horrobin, 2005).

### **Cambios en la longevidad humana a través del tiempo**

La esperanza de vida de los humanos ha variado a lo

largo de su existencia. En la prehistoria era de 30 años; en las antiguas Roma y Grecia, se mantuvo en esa misma edad a causa del hacinamiento de la población y a la consiguiente aparición de enfermedades como la tuberculosis y la fiebre tifoidea. Durante la Edad Media, la esperanza de vida aumentó sólo a 35 años debido principalmente a hambrunas y epidemias. En el siglo XIX, el cólera e infecciones causadas por deficiencias sanitarias como la tuberculosis hicieron que alcanzara apenas los 40 años. El descubrimiento y desarrollo de antibióticos, las mejoras en la ingeniería sanitaria y el desarrollo de la salud pública y la terapéutica médica lograron llevar la esperanza de vida a los 81 años en el siglo XX y a los 83 años en la primera década del siglo XXI. Sin embargo, este indicador aún difiere entre sexos, estratos económicos y países. Las epidemias de enfermedades como el sida y los conflictos armados la han reducido en varias naciones a cifras características de décadas anteriores. Su disparidad geográfica es tal que el promedio de vida global se reduce a 68 años, con un máximo de 83 años en Japón (79 años para hombres y 86 años para mujeres) y un mínimo de 42 en Afganistán (40 años para hombres y 44 para mujeres) y Zimbabwe (42 años para hombres y mujeres) (Galor, 2007; OMS, 2011; Parkin, 1992; Shrestha, 2006).

Así, pues, la extensión de la vida no es algo nuevo, sino que se ha desarrollado de manera gradual e indirecta al mejorar la salud de los individuos y disminuir su mortalidad extrínseca, principalmente. Las causas más comunes de mortalidad en los países desarrollados en la actualidad son ya de carácter intrínseco: enfermedades cardiovasculares y cáncer. Nuevos tratamientos más eficaces sin duda elevarán las cifras ya alcanzadas. A pesar de ello, aun retirando estos padecimientos y la mortalidad extrínseca, la vida del humano parece tener un límite inmodificable, lo cual se aprecia en las estadísticas de longevidad máxima. El récord de longevidad máxima en el humano es 122.5 años, el cual solo ha sido alcanzado por una persona de los 7000 millones que viven en este planeta. Los últimos registros muestran que menos de 0.3% de las personas en el planeta son mayores de 100 años. Estos centenarios tienen, al parecer, mutaciones en algunos genes que les han permitido ser tan longevos, pero al mismo tiempo más saludables (ABS, 2010; Shrestha, 2006; UN, 1998).

Basados en estos hechos, la gerontología biomédica en el presente se centra en entender y estudiar los

procesos moleculares que conllevan al envejecimiento y enfermedades relacionadas, y que retardan el envejecimiento en modelos animales y en centenarios para desarrollar terapéuticas médicas y estrategias de prevención.

## **Estrategias para extender la vida**

### ***Estrategias generales***

Los mayores logros en la extensión de la vida se han obtenido en modelos animales. La restricción calórica fue uno de los primeros descubrimientos en el campo, a lo que siguió el hallazgo de genes cuyas mutaciones prolongaban la vida de los organismos en estudio por días, semanas o años. Algunos de estos genes forman parte de mecanismos o sistemas de regulación presentes en el humano; la complejidad en este último, aunado a que estas mutaciones producen efectos deletéreos graves, no ha permitido trasladar directamente dichos hallazgos al campo terapéutico. Desde hace varias décadas, las grandes estrategias generales para incrementar la longevidad han sido la criopreservación, la ingeniería genética, la farmacoterapia, la ingeniería de tejidos y la restricción calórica.

***Criopreservación:*** Consiste en la congelación controlada y permanente del cuerpo completo o una parte de éste, generalmente la cabeza, antes de la muerte celular con la intención de mantener las células intactas y en estasis hasta que los avances científicos necesarios para curar la enfermedad o prolongar la vida del individuo congelado se presenten, para entonces proceder a la descongelación y subsecuente terapia. En la segunda mitad del siglo XX se auguraba que esta técnica sería una gran vía de escape al tiempo. Sin embargo, la destrucción celular por formación de cristales al someterse al tejido a bajas temperaturas se presentó como un problema fundamental y disminuyó su confiabilidad. Nuevos métodos y soluciones de congelación se utilizan hoy en día, pero con resultados aún no completamente satisfactorios, lo cual ha disminuido su uso a sólo unas cuantas instituciones en el mundo.

***Ingeniería genética:*** Es la manipulación de los genes para producir cierto efecto deseado en el organismo. El uso de esta tecnología se encuentra aún en desarrollo y las principales limitantes son la carencia de suficientes vectores útiles para cada tejido, su baja efectividad, la

posibilidad de consecuencias fatales para el individuo y, la más importante, la falta de información completa acerca de los factores genéticos que regulan el envejecimiento con sus respectivas interacciones subcelulares.

**Farmacoterapia:** Aunque varios fármacos en estudio han mostrado resultados preliminares satisfactorios en modelos animales, estos efectos no han podido ser replicados por todos los grupos científicos ni en todos los organismos. Las pruebas clínicas son incipientes y ninguno puede aún ser recomendado para consumo humano. Además, la regulación ejercida por estos compuestos se ejerce en una sola molécula o expresión de un solo gen, lo que no resuelve el problema general y sí genera, en cambio, efectos secundarios potencialmente dañinos.

**Ingeniería de tejidos:** El remplazo de tejidos u órganos creados a partir de células madre se encuentra en etapa experimental. Estructuras epiteliales tubulares, vejigas, piel y tejido cardíaco son algunos de los avances que se han logrado en el laboratorio. Sin embargo, la formación de un órgano, con todos sus componentes celulares, requerirá más años de investigación, especialmente en lo que a factores de diferenciación se refiere.

El depósito de células madres en un tejido específico, generalmente mediante inyección, es un procedimiento que ya se realiza en todo el mundo, aunque no es un procedimiento seguro, ya que las células pluripotenciales no siempre se diferencian en la misma estirpe del tejido circundante, sino que pueden dar origen a tejidos completamente distintos y causar complicaciones médicas serias.

La congelación y futura viabilidad de células de cordón umbilical posterior al nacimiento, es exitosa en sólo una pequeña fracción de los cordones congelados. La rapidez y el manejo son factores claves que generan grandes variaciones en el resultado. Hasta el momento, sólo algunas instituciones públicas en el mundo dedicadas especialmente a la consolidación de un banco de cordones cuentan con la calidad, logística, infraestructura, recursos económicos y el personal capacitado necesario para asegurar que las unidades, una vez descongeladas, se encuentren libres de daño y puedan usarse como células madre.

**Restricción calórica:** El decremento de la ingesta calórica por debajo de las calorías necesarias por día es hasta el momento la estrategia más popular y efectiva para alargar la vida de los organismos. No se cuenta con resultados definitivos en humanos que aprueben su seguridad y aquellos que la siguen manifiestan astenia, adinamia, frío, hambre permanente; sus niveles de testosterona son extremadamente bajos y su libido es prácticamente inexistente. Algunos desarrollan alteraciones psicológicas. Estos efectos colaterales negativos son la causa de que el número de sus practicantes no aumente considerablemente. Los mecanismos por los que la restricción calórica actúa en humanos aún no son completamente comprendidos. Se necesita más tiempo para contar con registros suficientemente largos de su aplicación en humanos que permitan establecerla como una terapia eficaz (CR Society, 2011).

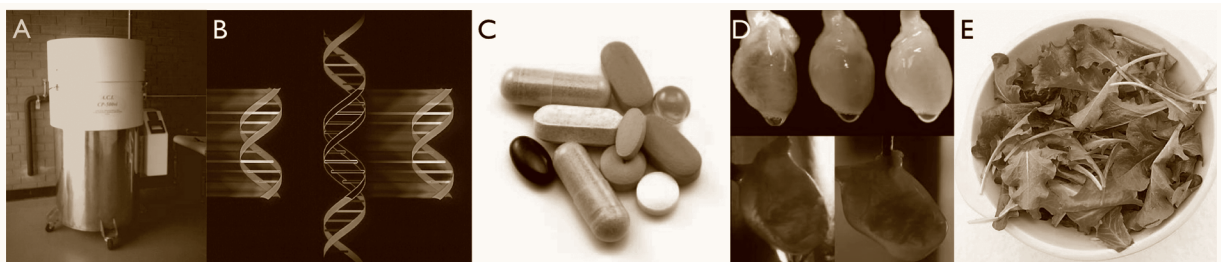


Figura 3. Estrategias generales contra el envejecimiento y enfermedades asociadas. A) Criopreservación: los restos orgánicos se colocan en contenedores térmicos o congeladores a temperaturas menores a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . B) Ingeniería genética: un gen es manipulado o remplazado por otro para tratar una condición o modificar una molécula. C) Farmacoterapia: compuestos modifican farmacológicamente el funcionamiento de mecanismos y sistemas subcelulares. D) Ingeniería de tejidos: en la imagen una matriz con forma de corazón es cubierta con células madre inducidas para diferenciarse en músculo cardíaco. E) Restricción calórica: el incremento de la longevidad producida por la reducción en la ingesta de calorías es una estrategia relativamente antigua y bien conocida por el público.



**Estrategias moleculares**

Las estrategias necesarias para lograr la curación de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento desde el punto de vista molecular se enfocan en tres objetivos: la manipulación genética, el control de radicales libres y la eficiente eliminación de agregados proteicos.

**Manipulación genética:** Varios genes han sido identificados como reguladores de la longevidad en los organismos modelo, algunos de ellos se encuentran presentes en todos ellos y los componentes de sus vías no se conocen por completo. Al provocar mutaciones en ellos y/o sus niveles de expresión, la longevidad se incrementa. El incremento depende del sitio donde sucede la mutación en el gen y varía de organismo a organismo. Aún se necesitan varios años o décadas para lograr entender las completas interacciones de estos componentes, sus estructuras y los sistemas subcelulares de los cuales forman parte, aunque el inicio de pruebas clínicas pudiera estar más cercano.

**Control de radicales libres:** Algunas moléculas pequeñas, principalmente aquellas que contienen un oxígeno y que se forman como subproducto o escape de iones de la respiración celular, son altamente reactivas con los componentes subcelulares. Dichas moléculas cargadas son llamadas radicales libres y provocan daños al transformar químicamente los compuestos con los que reaccionan. Este daño

es particularmente importante cuando recae en ácidos nucleicos, en donde su correcta detección y reparación es primordial para asegurar la correcta transcripción y evitar la persistencia de posibles rupturas secundarias de cadena. La acumulación del daño no reparado a lo largo de la vida del individuo se traduce en mutaciones y alteraciones subcelulares que pueden transformar la célula en un tejido maligno, mermar su funcionamiento o producir su muerte. A nivel orgánico, las complicaciones derivadas de los últimos dos casos son las observadas en el proceso general del envejecimiento.

**Eficiencia de la eliminación de agregados proteicos:**

Aun si dentro de la célula se cuenta con un material genético íntegro y normal, y con una eliminación y control adecuado de los radicales libres, existe el problema de la eliminación de los agregados proteicos tóxicos. Algunas proteínas, al presentar anomalías estructurales localizadas –debidas a la exposición a agentes ambientales, radicales libres o alteraciones producidas antes y durante la transcripción–, tienden a agregarse y depositarse en el citoplasma, evadiendo los mecanismos de identificación y degradación proteica. Algunos de estos agregados son particularmente tóxicos para la célula, causando primariamente alteraciones de la membrana celular y de los organelos, e interferencia con otras proteínas y procesos celulares. Los agregados se incrementan con el paso del tiempo y su presencia se relaciona con la fisiopatología de enfermedades de carácter neurodegenerativo especialmente.

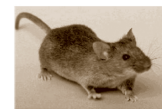
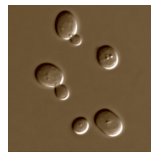


Tabla 1. Genes relacionados con la longevidad en diferentes modelos biológicos.



Figura 4. Estrategias moleculares para retardar el envejecimiento.

### Presente y futuro de la terapéutica para el retraso del envejecimiento y enfermedades asociadas

El desarrollo de la biología molecular ha permitido la identificación de potenciales objetivos subcelulares que pueden ser manipulados para prolongar la vida de los organismos. La carencia de suficientes datos científicos y el conocimiento relativamente reducido de sus interacciones y funciones completas es en el presente la limitante para poder manipular el envejecimiento en organismos superiores. Hoy aún no es posible detener el envejecimiento ni sus enfermedades relacionadas, aunque en teoría sí puede ser modificado. Un intenso desarrollo de la investigación científica en el campo de la biogerontología es aún necesario para desarrollar nuevas herramientas de estudio más eficaces, rápidas y económicas que permitan agilizar el avance en el área; describir completamente el proteoma de cada estirpe celular y entender sus interacciones es otro requerimiento fundamental. Para algunos padecimientos, la gerontología biomédica puede acceder transversalmente a los conocimientos conforme éstos se obtengan para trasladarlos al campo clínico sin necesidad de esperar a comprender completamente las redes de eventos inter e intracelulares. Las inversiones de la industria farmacéutica y del sector gubernamental en el área son ahora una realidad y se incrementan día tras día. Esta gran rama de la gerontología abandona la ciencia ficción para ofrecer resultados tangibles. El sector dermatológico cuenta ya con terapéuticas de retraso leve del envejecimiento en piel, las cuales están disponibles en

el mercado actual, que si bien no dejan de tener apenas un efecto transitorio, auguran una nueva revolución en la medicina. El retraso del envejecimiento es solo cuestión de tiempo y llegará de la mano de tratamientos efectivos para las enfermedades asociadas, pues en realidad ambos son las dos caras de la misma moneda. De los ciudadanos y científicos dependerá la adecuada reglamentación de dichas terapéuticas para canalizar tales tecnologías a un beneficio social y una causa netamente humanista. A pesar de los años que podamos ganarle al tiempo y a la enfermedad, las mismas preguntas existenciales que comenzaron cuando el ser humano desarrolló su inteligencia continuarán resonando a través de las generaciones.

1. Age-Retardation: Scientific possibilities and moral challenges, T.Ps.C.o. Bioethics, ed. The President's Council on Bioethics. 2002.
2. El funeral en Machu-Picchu (Museo de Sitio Manuel Chávez Ballón). 2011.
3. ABS. 3201.0 - Population by Age and Sex, Australian States and Territories. Australian Bureau of Statistics, Jun 2010.
4. Aufderheide AC. The scientific study of mummies. Cambridge University Press, 2003.
5. Cabada-Izquierdo JJ. Tlazolteotl: una divinidad del panteón azteca. Revista Española de Antropología Americana, 1992;22:123-138.
6. Chey S.O. y Cavendish, M. China Condensed: 5000 Years of History & Culture, 2006.
7. CR Society. Risks of calorie restriction. CR Society. 2011.
8. Davis JK. The Prolongevists Speak Up: The Life-Extension Ethics Session at the 10th Annual Congress of the International Association of Biomedical Gerontology. The American Journal of Bioethics, 2004:4.
9. Fields V et al. Lords of creation: the origins of sacred Maya kingship. Scala, 2005.
10. Galor O y Moav O. The Neolithic Revolution and Contemporary Variations in Life Expectancy. Working Papers, Brown University, Department of Economics. 2007: 14.
11. Gomara F. Historia General de las Indias. 1954.
12. Gordon AHS, Calvin W. The Quick and the Dead: Biomedical Theory in Ancient Egypt. 2004.
13. Graulich M. El sacrificio humano en Mesoamérica. Arqueología Mexicana, 2011;11:16-21.
14. Grube N, et al. Maya: divine kings of the rain forest. 2006.
15. Hannabuss S. Dictionary of Hindu Lore and Legend, vol. 17. 2003.
16. Herodotus. The Histories. Oxford UP, 1998.
17. Horrobin S. The Ethics of Aging Intervention and Life-Extension. En: Aging Interventions and Therapies. World Scientific Publishing Company, Incorporated. 2005.
18. London, U.C. Chronology. 2011.
19. OMS. Life expectancy at birth. 2011.
20. Parkin TG. Demography and Roman Society. 1992.
21. Peck DT. Juan Ponce de Leon. McDonald & Woodward Publishing, 2000.
22. Principe LM. The Aspiring Adept: Robert Boyle and His Alchemical Quest. Princeton University Press, 1998.
23. Shrestha LB. CRS Report for Congress: Life Expectancy in the United States. 2006.
24. UN. Demographics of older persons. 1998.
25. Weindruch R, Walford, R.L. The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction. 1988.
26. Westfall RS. Never at Rest: A Biography of Isaac Newton. 1983.
27. Wright DC. The History of China. Greenwood Publishing Group. 2001.

### **Agustín Lugo Radillo**

Licenciatura de Médico Cirujano en la Universidad de Colima, México. Estudios de maestría y doctorado en Medicina Genética y Molecular en la Universidad de Sheffield, Reino Unido. Curso de Biología Molecular del Envejecimiento en el MBL, en Estados Unidos con beca completa de la Ellison Medical Foundation. Actualmente es investigador en Ciencias Médicas del Instituto de Geriátrica.



**Eunice López Muñoz**

Departamento de Genética, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Gineco-Obstetricia núm. 4 “Dr. Luis Castelazo Ayala”, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

astridkaryme2001@yahoo.com.mx

**Judith Villa Morales**

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

jusyvm@hotmail.com

El envejecimiento ha sido motivo de estudio desde tiempos inmemorables y, sin embargo, es una de las áreas de la biología que ha resistido los esfuerzos para ser catalogado o, incluso, definido. A lo largo del tiempo se han utilizado diferentes definiciones, la mayoría de las cuales coinciden en que se trata de 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 (Pérez y Sierra, 2009).

Habitualmente, el envejecimiento se asocia con enfermedades crónicas que pueden conducir a la muerte, entre ellas, enfermedades cardiovasculares, demencias y cáncer. Sin embargo, estas enfermedades no son parte del proceso de envejecimiento, sino una consecuencia del mismo. Además, existen otras condiciones asociadas al envejecimiento que, sin ser causas directas de muerte, son responsables del deterioro en la calidad de vida del anciano, por ejemplo, sarcopenia (Landi *et al.*, 2011), osteoporosis (Syed y Ng, 2010), artritis y enfermedades autoinmunes (Goronzy *et al.*, 2010).

Es importante mencionar que otros factores biológicos, como la disminución en la resistencia a infecciones y la pérdida de la capacidad regenerativa, también influyen considerablemente en la calidad de vida del adulto mayor (Shaw *et al.*, 2010). Dado que vivimos en una sociedad que envejece a una velocidad acelerada, se ha tornado apremiante la creciente necesidad de comprender tanto los aspectos fisiológicos como las bases moleculares del envejecimiento y las enfermedades asociadas a éste, para lograr un incremento en la expectativa y calidad de vida (Pérez y Sierra, 2009). Actualmente, a nivel mundial se realizan múltiples investigaciones en el área biomédica que tratan de identificar los factores moleculares, genéticos, genómicos, transcriptómicos y proteómicos, entre otros, implicados en el proceso de envejecimiento.

El objetivo de este capítulo es presentar una revisión sobre algunos aspectos metodológicos trascendentales en el desarrollo de proyectos de investigación biomédica en materia de envejecimiento, sin olvidar que no existe un planteamiento que se considere unánimemente como el mejor. Rara vez un estudio por sí mismo puede considerarse bueno o malo, y no basta con juzgar un

estudio por su metodología, ni un estudio puede valorarse sólo por sus métodos, ya que tanto los métodos como los resultados son importantes (Hulley y Cummings, 1993).

### **Diseño del estudio**

El diseño del estudio es un asunto complejo que involucra diversas decisiones. Por ejemplo, es fundamental conocer si el investigador se mantendrá aparte de los hechos que ocurran en la unidad de análisis (animales, cultivos celulares o humanos), en cuyo caso el estudio se denominará observacional, o bien, si se estudiarán los efectos de una intervención por parte del investigador en la unidad de análisis, en cuyo caso se denominará experimental (figura 1) (Hulley y Cummings, 1993).

### **Estudios observacionales**

A su vez, los estudios de tipo observacional se clasifican en *descriptivos*, si únicamente se detallan las características o variables de estudio (apoyándose en la estadística descriptiva), y *analíticos* si se trata de encontrar relaciones entre las variables de estudio y/o diferencias entre dos o más grupos de individuos (apoyándose en la estadística inferencial).

Si el investigador elige un diseño observacional, su siguiente decisión será el número de veces que realizará las mediciones del evento a estudiar, siendo un estudio *transversal* cuando las mediciones se realizan en una ocasión (ejemplos de estudios transversales en humanos son aquellos que incluyen comparaciones de familias de centenarios o nonagenarios con familias de expectativa de vida promedio, o bien la descripción de perfiles de expresión en un tejido o cultivo celular determinado); y *longitudinal* cuando las mediciones se realizan en diversas ocasiones a lo largo de un periodo, lo que implica el seguimiento de los individuos de estudio (*cohorte*).

Posteriormente, deberá decidirse si el estudio longitudinal se enfocará exclusivamente en hechos pasados, es decir, de tipo *retrospectivo*, o si se seguirá a los individuos de estudio de forma *prospectiva*, con el fin de detectar hechos que aún no ocurren en el momento de iniciar el estudio. Los estudios de cohorte proporcionan información acerca de la *incidencia* de desenlaces y el *riesgo relativo* (el cociente entre la incidencia de una enfermedad entre individuos expuestos a un factor determinado y la incidencia en los no expuestos). Ejemplos de estudios longitudinales

incluyen: mediciones repetidas de la longitud telomérica en un cultivo celular conforme se alcanza la senescencia replicativa y cohortes de individuos en las que se efectúan mediciones repetidas para determinar cómo y cuándo ocurren cambios en los tejidos en función de la edad cronológica, y para tratar de asociar estos cambios con determinados factores, genes o vías implicados en el proceso de envejecimiento (Newman, 2010; Tappen y Ouslander, 2010; Slagboom *et al.*, 2011).

En caso de que se requiera identificar factores de riesgo con un diseño más económico que el de la cohorte, pueden compararse las variables de estudio en el grupo de individuos que presenta el desenlace (*casos*) con respecto a un grupo de referencia que no presenta el desenlace (*controles*) para obtener información acerca de la razón de momios u *odds ratio* (OR). Ejemplos de este tipo de estudios incluyen la comparación de perfiles de expresión génica o la presencia de un determinado polimorfismo en familias con centenarios o nonagenarios con respecto a familias con expectativa de vida promedio, o bien, en un grupo de individuos con una enfermedad determinada con respecto a un grupo de referencia sin la enfermedad (Passtoors *et al.*, 2008; Slagboom *et al.*, 2011).

En lo que respecta a estudios sobre biomarcadores y *pruebas diagnósticas*, existe una variable predictora (*resultado de la prueba*) y una variable de efecto o de desenlace (la enfermedad, determinada por un *estándar de oro*). Su objetivo es determinar la fuerza de la asociación entre ambas variables, basándose en su *sensibilidad* (proporción de individuos con la enfermedad que presenta un resultado positivo) y *especificidad* (proporción de individuos sin la enfermedad que presenta un resultado negativo). El investigador determina el punto de corte apropiado para considerar un resultado como positivo. También deben determinarse el *valor predictivo de un resultado positivo* (probabilidad de que un individuo con un resultado positivo presente en realidad la enfermedad) y el *valor predictivo de un resultado negativo* (probabilidad de que un individuo con un resultado negativo no presente en realidad la enfermedad) (Hulley y Cummings, 1993). Un ejemplo de este tipo de estudio es la validación de un determinado polimorfismo en la secuencia de ADN, cambios en la expresión génica a nivel mRNA (transcriptómica) o cambios de expresión génica a nivel proteína (proteómica) con potencial

utilidad diagnóstica en el proceso de envejecimiento o en enfermedades asociadas (David *et al.*, 2010; Siwy *et al.*, 2011; Slagboom *et al.*, 2011; Cordell y Clayton, 2005).

### **Estudios experimentales**

Los experimentos, desde el punto de vista metodológico, son estudios de cohortes en los que el investigador manipula la variable predictora (la intervención) y observa el efecto sobre un desenlace. Los experimentos tienen mayor fuerza en cuanto a la identificación de causalidad y es el mejor diseño para controlar la influencia de variables de confusión (Hulley y Cummings, 1993). La inferencia de causalidad se basa en la comparación de los desenlaces observados en individuos clasificados según la intervención que recibieron.

En los *diseños intergrupos* se comparan los desenlaces observados en dos o más grupos de individuos que reciben diferentes intervenciones, mientras que en los *diseños intragrupos* se comparan los desenlaces observados en un solo grupo antes y después de aplicar una intervención. Ejemplos de experimentos incluyen el uso de modelos animales transgénicos, de inhibidores de la expresión de microRNAs (Kundu y Slack, 2010), así como el uso de moléculas farmacológicas con potencial terapéutico en modelos animales, cultivos celulares y humanos, entre otros.

Los diseños entre grupos son los más utilizados en investigación clínica y biomédica; uno de ellos, el *ensayo aleatorizado* (asignación al azar de los individuos a uno u otro grupo de estudio) y *cegado* (simple, doble o triple ciego; es decir ocultar la asignación de la intervención al individuo de estudio, a la persona que administra la intervención y/o a la persona que mide el desenlace), se presenta con frecuencia como el estándar óptimo frente al cual se deben comparar todos los demás diseños. Es importante mencionar que, en investigación biomédica, algunos estudios no se adecuan fácilmente a estos moldes; sin embargo, una descripción precisa del tipo de estudio facilita la realización del mismo (Burton *et al.*, 2005).

No hay un enfoque que sea preferible a los demás, de modo que cada investigador deberá seleccionar el diseño que sea el más eficaz para dar una respuesta satisfactoria a su pregunta de investigación y, aun cuando se ha discutido que los estudios observacionales tienen

ciertas limitaciones, resultan invaluable al proveer información inicial para el posterior desarrollo de estudios experimentales (Hulley y Cummings, 1993).

Para ciertos tipos de intervenciones –particularmente el desarrollo de nuevos fármacos–, la experimentación animal puede ser el primer paso en el reconocimiento de una potencial intervención, pero cuando no hay un modelo animal, datos obtenidos de estudios observacionales pueden constituir el primer paso en la identificación de una intervención útil.

Los estudios experimentales se han considerado como el diseño con mayor fuerza para demostrar causalidad, sin embargo, en ocasiones resulta impráctico y poco ético realizar este tipo de estudios, sobre todo en aquellos casos en los que un estudio longitudinal observacional ha demostrado que la exposición a ciertos factores resulta dañina para el organismo (Guralnik y Kritchevsky, 2010).

**Tamaño de la muestra**

El objetivo de la planificación del tamaño de muestra es estimar el número adecuado de individuos o unidades de análisis para un determinado diseño de estudio que

permita detectar una asociación de un tamaño de efecto determinado con una probabilidad específica de cometer *errores tipo I* ó  $\alpha$  (falsos positivos) y de cometer *errores tipo II* ó  $\beta$  (falsos negativos). La estimación del tamaño de la muestra puede revelar que un diseño no es factible, por lo que debe calcularse en una fase temprana del desarrollo del proyecto, cuando aún pueden realizarse modificaciones apropiadas en el diseño.

El cálculo de tamaño de muestra se basa en la *hipótesis de trabajo*, cuyo principal objetivo es establecer la base para las pruebas de *significancia estadística*. Dado que la mayoría de los estudios observacionales y todos los estudios experimentales tratan sobre preguntas de investigación que implican comparaciones, en la mayoría de los estudios es necesario especificar por lo menos una hipótesis. Así, la estimación del tamaño de muestra dependerá de la hipótesis planteada, de la prueba estadística seleccionada y de los valores apropiados de  $\alpha$  y  $\beta$  (Hulley y Cummings, 1993).

**Planificación de las mediciones**

Las mediciones son un tipo de observaciones que describen los fenómenos de modo que se puedan analizar

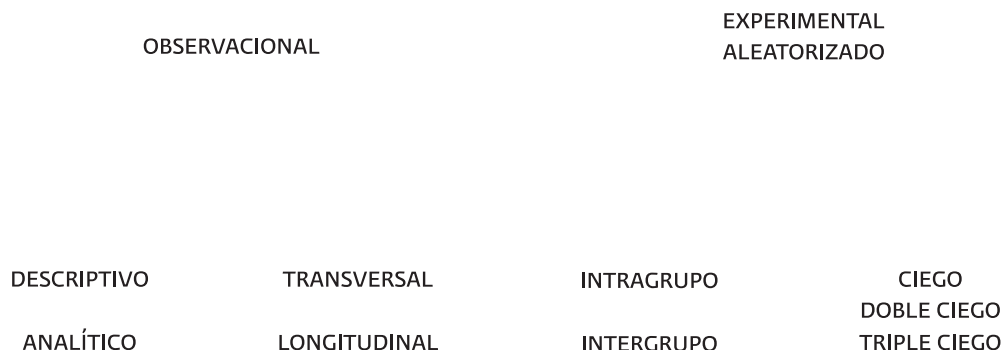


Figura 1. Clasificación general del diseño de estudio.



estadísticamente. La *validez externa* de un estudio depende de la certeza con que las variables diseñadas representen el fenómeno de interés y la *validez interna* depende de la certeza con que las mediciones que se realizan representen a las variables (Hulley y Cummings, 1993).

### **Escalas de medición**

La clasificación de las escalas de medición se basa en el tipo de variables que resultan de la medición, lo cual es de suma importancia para la elección del análisis estadístico a ejecutar. En la tabla 1 se muestra una clasificación de las escalas de medición y de la información que proporcionan.

Tabla 1. Clasificación de escalas de medición.

Es conveniente mencionar que es preferible utilizar mediciones que produzcan valores numéricos continuos, ya que la información que contienen propicia un estudio con mayor poder y/o una muestra de menor tamaño.

Las mediciones de las variables deben ser precisas (cada vez que se mide se obtiene prácticamente el mismo valor y se obtiene al estandarizar los métodos de medición, entrenar al observador, calibrar y automatizar los instrumentos de medición, y repetir las mediciones) y exactas (representan lo que intentan representar y se pueden comprobar al comparar la medición con técnicas de referencia que se saben exactas) (Hulley y Cummings, 1993).

### **Unidad de análisis**

La elección de los individuos que participarán en el estudio (*unidad de análisis*) tiene el propósito de asegurar que los hallazgos observados en dicho estudio representen con exactitud lo que sucede en la *población*. Una población es un conjunto de individuos con una serie de características específicas, mientras que una *muestra* es un subconjunto de dicha población.

Metodológicamente, las poblaciones se definen en: *población diana* (grupos de individuos a los que se generalizarán los resultados del estudio) y *población accesible* (grupos de individuos que representen a la población diana). Ambas poblaciones serán definidas por la formulación de *criterios de selección* (inclusión, exclusión y eliminación). Posteriormente, se definirá la *muestra* (número de individuos de la población accesible que participarán en el estudio) y se planteará la forma en la que se obtendrá (*muestreo*). Desafortunadamente, no siempre la muestra que se diseña es la que realmente se estudia, ya que pueden ocurrir pérdidas, por lo que los resultados deben generalizarse a partir de los individuos realmente estudiados hacia la muestra diseñada (Hulley y Cummings, 1993).

### **Unidades de análisis en investigación biomédica en materia de envejecimiento**

La unidad de análisis se refiere al qué o quién es el objeto de interés en una investigación y puede corresponder a diferentes categorías. En el caso de investigación biomédica en materia de envejecimiento se han utilizado modelos animales, líneas celulares y modelos humanos como unidades de análisis para tratar de entender los factores relacionados con el envejecimiento y enfermedades asociadas (Hulley y Cummings, 1993).

### **Modelos animales**

Debido a que el proceso de envejecimiento ocurre de manera similar en muchas especies, se ha hipotetizado que los mecanismos moleculares subyacentes son los mismos o al menos bastante similares. La evidencia científica ha sustentado la homología molecular entre especies y ha validado la gran utilidad de la investigación sobre envejecimiento en modelos animales. De esta manera, ha sido posible la identificación de diversos mecanismos involucrados en el proceso de envejecimiento y enfermedades crónicas relacionadas a éste, así como

evaluar posibles intervenciones con potencial relevancia para el envejecimiento en humanos. La identificación de vías genéticas y metabólicas implicadas en la regulación de la longevidad se ha basado en la integración de datos obtenidos de especies animales comúnmente usadas en la investigación sobre envejecimiento.

La levadura del pan, *Saccharomyces cerevisiae*, es uno de los organismos más usados en la investigación del envejecimiento. Otras especies de levaduras también han provisto información útil e invaluable, siendo modelos alternativos en el estudio del envejecimiento la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* y *Kluyveromyces lactis*. En comparación con otros sistemas, la relativa facilidad y rapidez con la que se puede cuantificar la longevidad en las levaduras ha producido un incremento en el conocimiento de algunos mecanismos moleculares relacionados con el envejecimiento y ha permitido la identificación de factores que modifican la longevidad en este organismo. Se han establecido dos modelos de envejecimiento en levaduras: *envejecimiento replicativo*, un modelo de células mitóticamente activas en las cuales la expectativa de vida de la célula progenitora es definida por el número de células hijas producidas antes de la senescencia, y *envejecimiento cronológico*, un modelo de envejecimiento de células posmitóticas en las que la expectativa de vida es definida por la cantidad de células que sobreviven en un estado de no división o estado similar al quiescente. Aun cuando la evidencia sugiere que algunos aspectos del envejecimiento son específicos para estos organismos, muchas características han sido conservadas evolutivamente en especies invertebradas y roedores (Kaeberlein, 2010).

En cuanto a *Caenorhabditis elegans*, un modelo de vida media corta, su estudio ha llevado a la identificación de al menos una centena de genes que, al ser mutados, incrementan la expectativa de vida y en muchos casos mantienen la vitalidad fisiológica. Inicialmente, la investigación en *C. elegans* se enfocó en la genética del envejecimiento y en mutaciones génicas que incrementan dramáticamente la expectativa de vida del gusano; sin embargo, se ha logrado identificar vías altamente conservadas y determinantes de la longevidad (Schaffitzel y Hertweck, 2006). Actualmente, se realizan diversas y variadas aproximaciones en el estudio de envejecimiento en *C. elegans*, que van desde estudios

evolutivos, poblacionales y de enfermedades asociadas al envejecimiento, hasta manipulaciones ambientales como restricción calórica y tratamientos horméticos, así como ensayos de medicamentos y sustancias que incrementan la expectativa de vida, entre otros (Olsen *et al.*, 2006; Partridge, 2011).

Por otro lado, la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, ha sido un excelente modelo para el estudio de los mecanismos de envejecimiento debido a su expectativa de vida corta, fácil mantenimiento y bajo costo. El papel de varios genes de la vía de señalización TOR en la regulación de la longevidad fue identificada en este modelo (Rogina, 2010; Katewa y Kapahi, 2010). *D. melanogaster* permite el estudio continuo del envejecimiento del organismo y evita la influencia de células recientemente divididas ya que sus células son posmitóticas (con excepción de algunas células del intestino y las gónadas). Su longevidad se ve afectada por diversas manipulaciones ambientales, tales como la temperatura, estado reproductivo y contenido dietético alimentario o medicamentoso (Katewa y Kapahi, 2010). *D. melanogaster* comparte vías evolutivamente conservadas que regulan el envejecimiento en mamíferos y se ha descrito la presencia de diversas poblaciones de células madre adultas en ovario, testículo e intestino, que juegan un papel activo en el mantenimiento de la homeostasis tisular local (similar a lo que ocurre con células madre en mamíferos), por lo que es un modelo útil para el estudio de la relación entre células madre y envejecimiento (Wang y Jones, 2010).

En lo que respecta a los roedores, son los mamíferos mejor estudiados en términos de biología y genética. Los ratones y las ratas son modelos valiosos que han permitido grandes progresos en la investigación biomédica debido a su tamaño pequeño, corta expectativa de vida, reproducción temprana y fácil mantenimiento en cautiverio. La investigación sobre envejecimiento ha usado ratones y ratas en forma extensa para generar mutantes de vida corta y larga, así como estudios de restricción calórica, entre otros.

Dado que la expectativa de vida de ratones y ratas es corta, son un modelo útil para su estudio en el laboratorio; sin embargo, ha resultado de particular interés utilizar nuevos modelos mamíferos con una expectativa de vida larga, de tal manera que la tasa de envejecimiento sea similar a la de

los humanos. Así, se han utilizado especies de la orden de los roedores con gran diversidad en cuanto a la velocidad de envejecimiento como topos, castores, puercoespines y ardillas (Gorbunova *et al.*, 2008).

En un intento por dilucidar las diferencias en el proceso de envejecimiento entre especies de vida corta con respecto a especies de vida larga, también se han realizado estudios en mamíferos con una expectativa de vida excepcionalmente larga en relación a su tamaño corporal; tal es el caso de la rata topo desnuda (*Heterocephalus glaber*), con una expectativa de vida de 17 años, y el pequeño murciélago café (*Myotis lucifugus*), con una expectativa de vida de aproximadamente 34 años en su ambiente natural (Austad, 2009; Selman y Withers, 2011).

Además, se han realizado estudios del proceso de envejecimiento en pájaros, organismos que viven tres veces más que un mamífero del mismo tamaño, lo cual es muestra de su relativa resistencia a procesos degenerativos asociados a la edad. Aun cuando los pájaros parecen envejecer lentamente, se ha observado que el deterioro asociado a la edad es similar al de los mamíferos y humanos (Austad, 2011; Ricklefs, 2010). Reciente investigación en pájaros y mamíferos ha demostrado la participación del patrón de crecimiento temprano e historia reproductiva en los cambios relacionados con la edad, y que la tasa de envejecimiento puede ser influida por los genes y la edad materna cuando el individuo nace (Clutton-Brock y Sheldon, 2010).

Dada la complejidad de la fisiología humana, se requiere de modelos animales filogenéticamente más similares al humano, por lo que también se ha realizado investigación en primates como una valiosa aproximación para elucidar la naturaleza y causas del proceso de envejecimiento observado en humanos, así como la evaluación de intervenciones potenciales. Una de las ventajas del uso de modelos primates es su homología genética con los humanos (92.5 a 95%), además de que estos animales están bien adaptados para la investigación de laboratorio, incluyendo crianza, nutrición y medicina veterinaria.

En cuanto a las desventajas, se encuentran la baja disponibilidad, costos de mantenimiento, heterogeneidad genética y riesgo de transmisión de enfermedades entre especies, así como las implicaciones en tiempo, recursos

y esfuerzos que los estudios de tipo longitudinal conllevan (Roth *et al.*, 2004).

Cabe mencionar que se han utilizado otros modelos animales en el estudio del envejecimiento, entre lo que se incluyen el pez cebra y el pez guppie (*Danio rerio* y *Poecilia reticulata*) (Kishi *et al.*, 2009; Gerhard GS, 2007), abejas (Keller y Jemielity, 2006), perros domésticos (Waters, 2011), gatos y caballos (Bonnett y Egenvall, 2010), entre otros. El estudio del proceso de envejecimiento en diversos modelos animales ha tenido gran relevancia y han sustentado la participación de diversas vías, por ejemplo, la vía de señalización insulina/IGF-I, de hormonas lipofílicas, de respuesta a estrés oxidativo, de señalización TOR, TUBBY y JNK-1, así como genes involucrados en restricción calórica, en función mitocondrial, actividad deacetilasa de SIRT2 y longitud telomérica (Wheeler y Kim, 2011).

### **Cultivos celulares**

El estudio de cultivos de células somáticas normales constituye un modelo que mimetiza los cambios celulares y moleculares asociados con el envejecimiento. Los cultivos celulares muestran senescencia replicativa; sin embargo, se ha propuesto que el límite en la vida replicativa se debe a la incapacidad de las células para adaptarse, dado el estrés generado por las condiciones inherentes al cultivo. La hipótesis de la relación entre senescencia replicativa y envejecimiento proviene de la observación de la disminución de la expectativa de vida de fibroblastos de piel en cultivo en función de la edad del donador de dichas células, sin embargo, esto no ha sido totalmente confirmado (Phipps *et al.*, 2007; Kuilman *et al.*, 2010). De hecho, se ha reportado que cuando se modulan ciertas vías y condiciones del cultivo celular para obtener un fenotipo senescente, éste ocurre independientemente de la proliferación celular.

Por otro lado, el cultivo celular requiere someterse en forma continua a proliferación celular, lo cual no ocurre en el organismo completo, además de que las necesidades metabólicas y condiciones de crecimiento son diferentes. Aun cuando se ha llegado a cuestionar si los estudios en cultivos celulares representan con exactitud lo que ocurre en el organismo, el estudio de cultivos celulares, particularmente de fibroblastos, ha permitido la identificación de algunos biomarcadores de

envejecimiento como el IGF-1 (Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1), EGF (Factor de crecimiento epidérmico) y SA- $\beta$ -gal (galactosidasa beta asociada a envejecimiento), entre otros. Además, la experimentación en cultivos celulares también ha llevado al desarrollo de terapias que enlentecen algunos cambios adversos asociados con el envejecimiento (Phipps *et al.*, 2007).

### Modelos humanos

Se ha observado que en algunos humanos se retrasa la aparición de signos de envejecimiento, lo que lleva a un incremento en la expectativa de vida. Por esta razón se han realizado múltiples estudios para comparar individuos de 90 a 100 años de edad (nonagenarios y centenarios) y sus familias, con respecto a los que presentan una expectativa de vida promedio, logrando identificar algunos polimorfismos en genes que están asociados con la longevidad, entre los que se incluyen *APOE* y *FOXO3* (Flachsbart *et al.*, 2009). Sin embargo, las asociaciones reportadas en humanos ocurren en un pequeño porcentaje de la población y/o no han logrado ser replicadas en poblaciones diferentes (Novelli *et al.*, 2008). Además, es importante considerar que pueden existir variaciones aun en un mismo individuo, por lo que se han utilizado diversos tejidos provenientes de biopsias o muestras de sangre periférica para realizar estudios de moléculas y vías que participan en el envejecimiento.

Para tratar de identificar las diferencias moleculares asociadas con el envejecimiento en humanos, una aproximación atractiva ha sido el uso de microarreglos para identificar genes que presentan cambios de expresión con la edad (genes regulados por la edad). Los cambios en la expresión génica pueden conducir a cambios tisulares y funcionales importantes relacionados con el envejecimiento. Se han generado perfiles transcripcionales de diversos tejidos humanos, entre los que se incluyen cerebro, sangre, ojo, riñón, músculo y piel, entre otros. El mayor objetivo de estos estudios es la identificación de nuevos biomarcadores que puedan ser usados como indicadores de edad fisiológica. La identificación de genes y vías que se asocian con la edad fisiológica revelará procesos importantes en el envejecimiento de tejidos particulares (Wheeler y Kim, 2011).

Por otro lado, también se ha considerado el estudio de individuos con síndromes de envejecimiento prematuro

como un modelo útil para la identificación de vías que participan en el proceso de envejecimiento.

### Aspectos bioéticos

El cuidado, el uso apropiado y el trato digno de los modelos animales en la investigación biomédica requiere de conocimiento especializado del ambiente, procesos y procedimientos relacionados con su uso y cuidado, lo cual implica el establecimiento de condiciones de higiene, infraestructura y de trabajo apropiadas. Además de tomar en cuenta el respeto por la vida, por el dolor o el sufrimiento que los modelos animales pueden experimentar, por lo que deberán respetarse los principios éticos internacionales y de bioseguridad para la investigación biomédica con animales (Cardozo de Martínez *et al.*, 2007).

En lo que respecta a la investigación biomédica en modelos humanos, se han desarrollado tres principios éticos generales: respeto a las personas (tratar a los individuos como autónomos y obtener su consentimiento informado para participar en un proyecto de investigación), beneficencia (diseño de protocolos válidos y generalizables que aseguren que los beneficios de la investigación son proporcionales a los riesgos corridos por los participantes) y justicia (los beneficios y las cargas de la investigación se distribuyan equitativamente) (Hulley y Cummings, 1993).

Todo proyecto de investigación biomédica con modelos humanos deberá realizarse de acuerdo con la reglamentación internacional y de acuerdo con el Reglamento de la Ley general de salud en materia de investigación para la salud (Reglamento de la Ley general de salud). Por último, es importante recalcar que todo proyecto de investigación biomédica deberá ser evaluado por un comité de investigación, de ética y de bioseguridad, previo al inicio de cualquier estudio, para asegurarse de que cumple con los requisitos necesarios para llevarse a cabo.

1. Austad SN. Candidate bird species for use in aging research. *ILAR J*. 2011; 52(1):89-96.
2. Austad SN. Comparative biology of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009; 64(2):199-201.
3. Baum A, Grunberg N. Measurement of stress hormones. In Cohen S, Kessler RC, Gordon LU (eds). *Measuring stress: A guide for health and social scientists*. New York: Oxford University Press. 1997: 75-192.
4. Bonnett BN, Egenvall A. Age patterns of disease and death in insured Swedish dogs, cats and horses. *J Comp Pathol*. 2010; 142(Suppl 1):S33-S38.
5. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet*. 2005; 366(9489):941-951.
6. Cardozo de Martínez CA, Martínez CAMOC, Rodríguez YE, Lolas SF. El animal como sujeto experimental aspectos técnicos y éticos. Chile: CIEB, Universidad de Chile. 2007.
7. Clutton-Brock T, Sheldon BC. Individuals and populations: the role of long-term, individual-based studies of animals in ecology and evolutionary biology. *Trends Ecol Evol*. 2010; 25(10):562-573.
8. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet*. 2005; 366(9491):1121-1131.
9. David DC, Ollikainen N, Trinidad JC, Cary MP, Burlingame AL, Kenyon C. Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS Biol*. 2010; 8(8):e1000450.
10. Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanche H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A. Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(8):2700-2705.
11. Gerhard GS. Small laboratory fish as models for aging research. *Ageing Res Rev*. 2007; 6(1):64-72.
12. Gorbunova V, Bozzella MJ, Seluanov A. Rodents for comparative aging studies: from mice to beavers. *Age (Dordr)*. 2008; 30(2-3):111-119.
13. Goronzy JJ, Shao L, Weyand CM. Immune aging and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2010; 36(2):297-310.
14. Guralnik JM, Kritchevsky SB. Translating research to promote healthy aging: the complementary role of longitudinal studies and clinical trials. *J Am Geriatr Soc*. 2010; 58(Suppl 2):S337-S342.
15. Hulley SB, Cummings SR. *Diseño de la investigación clínica, un enfoque epidemiológico*. Barcelona: Doyma. 1993.
16. Kaeberlein M. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature*. 2010; 464(7288):513-519.
17. Katewa SD, Kapahi P. Role of TOR signaling in aging and related biological processes in *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol*. 2010, Dec 2. [Epub ahead of print].
18. Keller L, Jemielity S. Social insects as a model to study the molecular basis of ageing. *Exp Gerontol*. 2006; 41(6):553-556.
19. Kishi S, Slack BE, Uchiyama J, Zhdanova IV. Zebrafish as a genetic model in biological and behavioral gerontology: where development meets aging in vertebrates—a mini review. *Gerontology*. 2009; 55(4):430-441.
20. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010; 24(22):2463-2479.
21. Kundu ST, Slack FJ. Robust and specific inhibition of microRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol*. 2010; 9(3):20.
22. Landi F, Liperoti R, Fusco D, Mastropaolo S, Quattrocioni D, Proia A, Russo A, Bernabei R, Onder G. Prevalence and Risk Factors of Sarcopenia Among Nursing Home Older Residents, 2011; Mar 10. [Epub ahead of print].
23. Newman AB. An overview of the design, implementation, and analyses of longitudinal studies on aging. *J Am Geriatr Soc*. 2010; 58 (Suppl 2):S287-S291.
24. Novelli V, Viviani Anselmi C, Roncarati R, Guffanti G, Malovini A, Piluso G, Puca AA. Lack of replication of genetic associations with human longevity. *Biogerontology*. 2008; 9(2):85-92.
25. Olsen A, Vantipalli MC, Lithgow GJ. Using *Caenorhabditis elegans* as a model for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1067:120-128.
26. Partridge L. Some highlights of research on aging with invertebrates, 2010. *Ageing Cell*. 2011; 10(1):5-9.
27. Passtoors WM, Beekman M, Gunn D, Boer JM, Heijmans BT, Westendorp RG, Zwaan BJ, Slagboom PE. Genomic studies in ageing research: the need to integrate genetic and gene expression approaches. *J*

- Intern Med. 2008; 263(2):153-166.
28. Pérez V, Sierra F. Biology of aging. Rev Med Chil. 2009; 137(2):296-302.
29. Phipps SM, Berletch JB, Andrews LG, Tollesbol TO. Aging cell culture: methods and observations. Methods Mol Biol. 2007; 371:9-19.
30. Piazza JR, Almeida DM, Dmitrieva NO, Klein LC. Frontiers in the use of biomarkers of health in research on stress and aging. J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci. 2010; 65(5):513-525.
31. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Consultado el 11 de abril de 2011 en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>
32. Ricklefs RE. Insights from comparative analyses of aging in birds and mammals. Aging cell. 2010; 9(2):273-284.
33. Rogina B. For the special issue: Aging studies in *Drosophila melanogaster*. Exp Gerontol. 2010, Sept 7. [Epub ahead of print].
34. Roth GS, Mattison JA, Ottinger MA, Chachich ME, Lane MA, Ingram DK. Aging in rhesus monkeys: relevance to human health interventions. Science. 2004; 305(5689):1423-1426.
35. Schaffitzel E, Hertweck M. Recent aging research in *Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol. 2006; 41(6):557-563.
36. Selman C, Withers DJ. Mammalian models of extended healthy lifespan. Phil Trans R Soc B Biol Sci. 2011; 366(1561):99-107.
37. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. Curr Opin Immunol. 2010; 22(4):507-513.
38. Siwy J, Vlahou A, Zimmerli LU, Züribig P, Schiffer E. Clinical proteomics: current techniques and potential applications in the elderly. Maturitas. 2011; 68(3):233-244.
39. Slagboom PE, Beekman M, Passtoors WM, Deelen J, Vaarhorst AA, Boer JM, van den Akker EB, van Heemst D, de Craen AJ, Maier AB, Rozing M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Westendorp RG. Genomics of human longevity. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2011; 366(1561):35-42.
40. Syed FA, Ng AC. The pathophysiology of aging skeleton. Curr Osteoporos Rep. 2010; 8(4):235-240.
41. Tappen RM, Ouslander JG. State-of-the-art in longitudinal studies on aging: an overview of the supplement. J Am Geriatr Soc. 2010; 58(Suppl 2):S283-S286.
42. Wang L, Jones DL. The effects of aging on stem cell behavior in *Drosophila*. Exp Gerontol. 2010, Oct 30. [Epub ahead of print].
43. Waters DJ. Aging research 2011: exploring the pet dog paradigm. ILAR J. 2011; 52(1):97-105.
44. Wheeler HE, Kim SK. Genetics and genomics of human ageing. Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2011; 366(1561):43-50.

**Eunice López Muñoz**

Médico cirujano (Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, 1999). Un año de Especialidad en Medicina Interna (Universidad Nacional Autónoma de México-Hospital General de México, O.D. 2001). Especialista en Genética Médica (UNAM-IMSS, 2005). Maestra en Ciencias Médicas (UNAM-IMSS, 2007). Doctora en Ciencias Médicas (UNAM-IMSS, 2011). Candidata al Premio Nacional de la Juventud en 1995 y 1996. Ganadora de la medalla al mérito universitario, UAM, en 1999. Ganadora del primer lugar del Premio Héctor Márquez Monter, otorgado por la Asociación Mexicana de Genética a la mejor investigación en el área de genética, 2009. Profesor ayudante del Curso de Especialización en Genética Médica (2005- a la fecha). Participación en múltiples congresos nacionales e internacionales. Obtención de financiamiento para realización de diversos proyectos de investigación. Asesora metodológica y directora de diversas tesis de especialidad y maestría. Revisora, comentarista y sinodal en congresos, eventos académicos y exámenes de especialidad médica. Jefa del Departamento de Investigación Básica del Instituto de Geriátría (Octubre 2010-Junio 2011). Colaboradora de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, IMSS. Actualmente adscrita al Departamento de Genética del UMAE Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 "Dr. Luis Castelazo Ayala", IMSS. Líneas de investigación: Genética de poblaciones y bioestadística. Expresión génica y marcadores moleculares en cáncer de mama. Expresión génica y marcadores moleculares en envejecimiento.

**Judith Villa Morales**

Química clínica (Universidad Veracruzana, 1993). Maestra en Administración en Sistemas de Salud (Universidad Nacional Autónoma de México, 2004). Maestra en Biomedicina Molecular (Instituto Politécnico Nacional, 2009). Candidata al doctorado en Investigación en Medicina (IPN, 2011). Experiencia laboral en radioinmunoanálisis y clínica de tiroides, empleando dicha metodología para el diagnóstico de enfermedades endocrinas, con el uso de contadores gama y equipo de quimioluminiscencia en el Instituto Nacional de Ciencias Biomédicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán" (1993-1999). Experiencia en análisis de citogenética convencional y molecular en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS (2000 a la fecha) y en el Departamento de Genética Médica, del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", SSA (2003 a la fecha). Participación en diversos congresos nacionales e internacionales. Profesora adjunta en el área de citogenética del curso de Especialización en Genética Médica y Patología Clínica PUEM UNAM-IMSS, y profesora de sesión práctica del XL, XLI y XLII curso anual teórico-práctico de Genética Humana. Obtención de financiamiento para realización de diversos proyectos de investigación. Líneas de investigación: Citogenética molecular de enfermedades multifactoriales (correlación fenotipo-genotipo), implementación de técnicas moleculares en investigación aplicada (biomarcadores) y estudio de enfermedades neurodérmicas (neurofibromatosis tipo 1).





**Eunice López Muñoz**

Departamento de Genética, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Gineco-Obstetricia núm. 4 “Dr. Luis Castelazo Ayala”, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

astridkaryme2001@yahoo.com.mx

El envejecimiento es un proceso poligénico y estocástico en el cual hay deterioro progresivo de la salud y de la calidad de vida debido al incremento en el daño celular y tisular como consecuencia de falla en la homeostasis que involucra genes de mantenimiento y reparación, así como factores ambientales que conducen al daño celular (Alberts *et al.*, 2002). La evidencia de la participación de múltiples mecanismos en el proceso de envejecimiento proviene de investigaciones realizadas en modelos experimentales animales; sin embargo, su aplicabilidad al estudio del envejecimiento humano puede tener limitaciones ya que existen mecanismos especie-específicos. En este sentido, es complementario y de gran importancia el estudio de los mecanismos que participan en el desarrollo de desórdenes genéticos heredables en humanos, conocidos como síndromes progeroides, los cuales poseen características clínicas que recuerdan el proceso de envejecimiento (Domínguez-Gerpe y Araujo-Vilar, 2008).

Martin publicó en 1978 una lista de 162 síndromes genéticos definidos por 21 criterios o características similares a las encontradas en el envejecimiento humano; sin embargo, ninguno de estos síndromes incluyó todas las características propias del envejecimiento. Los síndromes progeroides se clasifican, según el rango de órganos y tejidos afectados, en segmentales –cuando se expresan en múltiples órganos y tejidos– y unimodales –cuando se manifiestan principalmente en un órgano o tejido (Martin, 1978). La mayoría de los síndromes progeroides son causados por una mutación en algún gen implicado en uno o más procesos de mantenimiento de la integridad del genoma (incluyendo los sistemas de replicación, reparación, transcripción y recombinación del ADN), por lo que han sido considerados modelos humanos para el estudio del envejecimiento (Longo y Finch, 2003).

En la actualidad, los síndromes progeroides segmentales mejor caracterizados y que han provisto información sobre las bases genéticas, bioquímicas y celulares del envejecimiento son el Síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford (HGPS, MIM ID #176670) y el Síndrome de Werner (WRN, MIM ID #277700) (Kudlow *et al.*, 2007).

### Síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford

Jonathan Hutchinson describió el primer paciente con HGPS en 1886 (Hutchinson, 1886) y Hastings Gilford le dio el nombre de progeria en 1904 (Gilford, 1904). El HGPS es una enfermedad genética rara con un modelo de herencia autosómico dominante (Eriksson *et al.*, 2003; Cao y Hegele, 2003), aunque existen reportes de algunos casos con modelo de herencia autosómico recesivo (Gabr *et al.*, 1960; Erecinski *et al.*, 1961; Maciel, 1988; Khalifa, 1989; Verstraeten *et al.*, 2006). Se han reportado aproximadamente 150 casos en todo el mundo (Kudlow *et al.*, 2007), con una incidencia estimada de 1 en 4-8 millones (Brown *et al.*, 1985).

Durante el embarazo y al nacimiento, los pacientes con HGPS parecen saludables, pero durante el primer año de vida desarrollan diversas características asociadas con envejecimiento tales como alopecia, aterosclerosis, pérdida acelerada de la movilidad articular, osteolisis, lipodistrofia severa, escleroderma e hiperpigmentación de la piel. Usualmente, el primer dato clínico es la presencia de una vena visible a través del puente nasal, seguido por la disminución en la velocidad de crecimiento con pérdida de la grasa subcutánea aproximadamente a los 6 meses de edad. La pérdida de color y cantidad de cabello, incluyendo pestañas y cejas ocurre tan temprano que los pacientes son alopécicos a la edad de 2-3 años. El desarrollo de caracteres sexuales secundarios es raro. En la tabla 1 se muestran las principales características clínicas de este grupo de pacientes.

El gen *LMNA*, responsable del HGPS, fue localizado en el cromosoma 1q22 a partir de la observación de dos casos de progeria con isodisomía uniparental en 1q y un caso con deleción intersticial paterna. En 2003, Eriksson y colaboradores (2003) reportaron mutaciones de *novó* en el gen de la lámina A como la causa de este síndrome. Existe evidencia de que los síndromes progeroides humanos son causados por defectos genéticos que interfieren con el procesamiento de farnesil-prelamina A para producir lámina A madura.

Las láminas son filamentos intermedios tipo V (IFs) y forman parte de los compuestos estructurales de la lámina nuclear, un andamiaje fibroso que subyace a la membrana interna nuclear y que determina la integridad y organización nuclear, incluyendo posicionamiento de los poros nucleares y conformación de la plataforma estructural, la cual conecta el material genético con la membrana nuclear (Gruenbaum *et al.*, 2005). Además, las láminas participan en la organización de la cromatina, replicación del ADN, transcripción y regulación del ciclo celular (Hutchinson, 2002).

Los mamíferos poseen tres genes de láminas, la lámina B1 (*LMNB1*) con expresión ubicua, la lámina B2 (*LMNB2*) y la lámina A/C (*LMNA*). Las láminas tipo B forman parte de la envoltura nuclear y son esenciales para la viabilidad celular y el desarrollo embrionario normal (Vergnes *et al.*, 2004). Las láminas tipo A tienen funciones más especializadas en células diferenciadas, participando en la homeostasis de los órganos y tejidos; incluyen dos productos mayores –las láminas A y C– y dos productos menores –las láminas AΔ10 y C2–, todas como producto del empalme alternativo del gen *LMNA*. La lámina C de 646 aminoácidos es producida por el procesamiento postraduccional del precursor prelámina A (Weber *et al.*, 1989).

La prelámina A posee un motivo CAAX en el extremo carboxilo terminal que está bajo farnesilación en su residuo Cys. La prelámina A farnesilada es el sustrato específico de la metaloproteinasa de membrana Zmpste24, la cual en el ratón cataliza dos pasos distintos de endoproteólisis (Pendas *et al.*, 2002). Primero, los residuos AAX del extremo carboxilo terminal son recortados y el residuo farnesil-cisteína es carboximetilado por la metiltransferasa de membrana presente en el retículo endoplásmico. Durante o después de su incorporación a la lámina nuclear, Zmpste24 corta los últimos 15 residuos y se libera la lámina A madura (Domínguez-Gerpe *et al.*, 2008).

La mayoría de los casos de HGPS son causados por mutaciones puntuales en el gen de *LMNA*. El p.G608G (1824, C\_\_\_\_T), que activa al sitio donador del empalme en el exón 11, es el más frecuente (Eriksson *et al.*, 2003; De Sandre-Givannoli *et al.*, 2003). Sin embargo, se han reportado otras mutaciones heterocigotas y homocigotas en pacientes con HGPS, tales como

Tabla 1. Características clínicas de HGPS. <http://omim.org/clinicalSynopsis/176670?search=Progeria%20Hutchinson-Gilford&highlight=hutchinsongilford%20progeria>

R471C, R527C, G608S, c.2036C>T, T528M, M540T, R644C, T623S, A57P, R133L, L140R, K542N; algunas de las cuales presentan una forma menos severa de la enfermedad (Csoka *et al.*, 2004; Cox y Faragher, 2007).

El uso del sitio donador del empalme del exón 11 resulta en un transcrito alternativo que porta una delección del marco de lectura de al menos 50 aminoácidos (607-656) codificados por el exón 11, pero no afecta el motivo CAAX (exón 12). Entonces, la prelámina A mutada en el HGPS (llamada progerina o lámina AΔ50) es farnesilada, pero pierde el sitio de corte proteolítico requerido para la liberación de la lámina A madura. Cantidades pequeñas de la prelámina A silvestre son sintetizadas por el alelo mutado, mientras que la lámina C no se afecta (Eriksson *et al.*, 2003). La progerina es dirigida hacia la membrana nuclear, en donde altera la integridad de dicha membrana (Young *et al.*, 2006).

La lámina A silvestre es liberada por corte enzimático de los 15 aminoácidos C-terminales. Sin embargo, tanto Cao y colaboradores (2007), como Dechat y colaboradores (2007) demostraron que aunque la progerina pierde el sitio de corte, este extremo sí se encuentra farnesilado y carboximetilado, mientras que Capell y colaboradores (2005) hipotizaron que la progerina sigue asociada en forma anormal con la membrana nuclear durante la mitosis, alterando el ensamblaje apropiado y la mitosis, causando así irregularidades de la membrana nuclear y expresión génica alterada.

En modelos de ratón con pérdida total de la lámina A, la morfología de la membrana nuclear y el fenotipo es normal y la transfección del alelo mutado a las células normales induce irregularidades de la membrana nuclear, puntualizando que la progerina actúa de una forma dominante negativa (Fong *et al.*, 2006; Goldman *et al.*, 2004). De hecho, De Sandre-Giovannoli y colaboradores (2003) demostraron la distorsión de la membrana nuclear en células de dos pacientes con HGPS que portaban la mutación p. G608G. Por otro lado, Erickson y colaboradores (2003) encontraron que 18 de 20 pacientes con mutaciones p.G608G también tenían anomalías en la membrana nuclear.

Como consecuencia de las alteraciones en el gen de LMNA, las células de HGPS muestran alteraciones en su

dinámica poblacional y en la arquitectura de la membrana nuclear, así como problemas con la replicación del ADN, reparación y transcripción. La pérdida de la lámina A o la acumulación de la progerina tienen tres consecuencias principales:

- 1) Pérdida de la integridad de la membrana nuclear y de su arquitectura, lo que conlleva cambios en la estructura de la cromatina y expresión génica aberrante.
- 2) Daño al ADN como resultado del secuestro aberrante de proteínas esenciales para la reparación por la progerina debido a su papel dominante negativo y pérdida de la señalización de dichas proteínas por la lámina A madura hacia sitios de daño.
- 3) Elevada tasa de recambio celular debido al incremento de la mitosis y apoptosis.

El papel de las láminas en HGPS aún no es del todo conocido, pero parece depender de su capacidad para anclar complejos multiproteicos a la membrana nuclear o en sitios específicos dentro del nucleoplasma (Broers *et al.*, 2006). En la figura 1 se pueden observar aquellos genes que se ha demostrado presentan co-expresión, co-localización, interacción génica, interacción física y participación en la misma vía molecular o son blancos predichos de acción de LMNA.

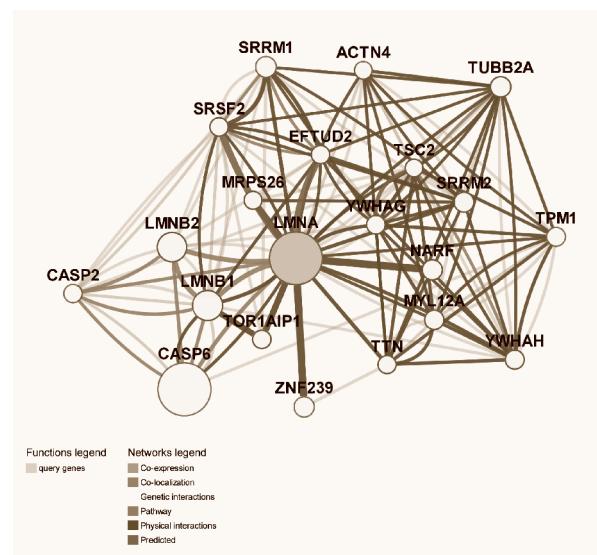


Figura 1. Proteínas incluidas en la red de LMNA <http://genemania.org>

Cabe mencionar que la morfología anormal del núcleo, incluyendo deformación de la membrana nuclear y pérdida de la forma esférica del núcleo, es la principal característica de la enfermedad y está asociada con la presencia de micronúcleos, donde el genoma ha sido fragmentado y compartimentalizado. El genoma fragmentado es incapaz de replicarse apropiadamente o de segregarse en la mitosis, lo cual activa la apoptosis (Cox y Faragher, 2007).

Existe evidencia de que la presencia de progerina –y no la ausencia de lámina A– ejerce efectos tóxicos en las células afectadas. También se ha mostrado que la prelámina A parcialmente procesada es tóxica para las células, mientras que la acumulación de la prelámina A no procesada (no isoprenilada) parece ser menos dañina. La prelámina A parcialmente procesada en células *Zmpste24*  $-/-$  interfiere con la formación de la lámina normal y causa alteraciones de la membrana nuclear, mismas que son normalizadas después de tratar dichas células con inhibidores de farnesil transferasa (Toth *et al.*, 2005).

### Síndrome de Werner

La descripción inicial de este síndrome fue realizada por Werner en 1904, con énfasis en las características clínicas: talla baja, catarata bilateral, cabello cano, alopecia y cambios parecidos a esclerosis dérmica con atrofia regional de la grasa subcutánea, úlceras profundas en la zona del tendón de Aquiles y del maleolo; además con alteraciones sistémicas asociadas a la edad avanzada tales como cáncer (sarcomas de tejido blanco, carcinoma de tiroides, osteosarcoma, melanoma lentiginoso acral y meningioma), osteoporosis, arteriosclerosis incluyendo aterosclerosis, hipogonadismo y diabetes mellitus (Werner, 1985; Brown *et al.*, 2010). El síndrome de Werner es una enfermedad genética rara con un modelo de herencia autosómico recesivo (Kudlow *et al.*, 2007). Las características clínicas aparecen con frecuencia al inicio de la segunda década de la vida, son progresivas y no son resultado de deficiencia primaria endócrina (Goto, 2001).

El diagnóstico clínico se realiza mediante los criterios diagnósticos que ha desarrollado el Registro Internacional de Síndrome de Werner, así como con estudios moleculares para identificar mutaciones en el gen WRN o documentar pérdida de la proteína (Huang *et al.*, 2006).

*Tabla 2. Características clínicas de Síndrome de Werner. <http://omim.org/clinicalSynopsis/277700?search=werner&highlight=werner>*

El gen responsable del síndrome de Werner (*WRN*) localizado en el cromosoma 8p12, fue identificado por clonación posicional en 1996 (Yu *et al.*, 1996) y consiste en 35 exones que codifican para una proteína de 1432 aminoácidos y 162 kDa, que es miembro del grupo de cinco helicasas RecQ humanas (*BLM*, *RECQL1*, *RECQL4* y *RECQ5*).

El análisis estructural de la proteína WRN en 1997 por Moser y colaboradores (1997), así como por Mushegian y colaboradores (1997), indicó que contiene un dominio RecQ tipo helicasa en la región central del polipéptido y un dominio nucleasa en la región N-terminal.

Actualmente, existe evidencia de que es una proteína multifuncional que interactúa con un gran número de proteínas para catalizar cuatro actividades enzimáticas dependientes de ADN: actividad ATPasa dependiente de ADN, helicasa intrínseca 3'→5' (Gray *et al.*, 2007), exonucleasa 3'→5' (Huang *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000), una cadena de apareamiento a ADN (Machwe *et al.*, 2005); interactúa con diversos factores que, se sabe,

tienen funciones trascendentales en el metabolismo del ADN.

Las actividades dependientes de ATP son requeridas para reacciones hidrolíticas, tales como reconocimiento estructural, unión a ADN e hidrólisis 3' terminal, así WRN utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para desenrollar la doble cadena del ADN, y su actividad exonucleasa y helicasa para catalizar la degradación de ADN con estructuras aberrantes (Shen y Loeb, 2000).

Cuando ocurre daño al ADN, WRN puede ser regulada por modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, sumoilación y acetilación (Ramírez *et al.*, 2007). Por ejemplo, la fosforilación de los residuos serina/treonina de WRN inhibe las funciones helicasa y exonucleasa, mientras que la hiperfosforilación las incrementa.

Por otro lado, WRN puede interactuar con otras proteínas y catalizar el desenrollamiento *in vitro* de ADN para la replicación, recombinación y reparación del mismo. En la figura 2 se pueden observar aquellos genes que se ha demostrado presentan co-expresión, co-localización, interacción génica, interacción física y participación en la misma vía molecular, o son blancos predichos de acción de WRN (Brosh y Bohr, 2002).

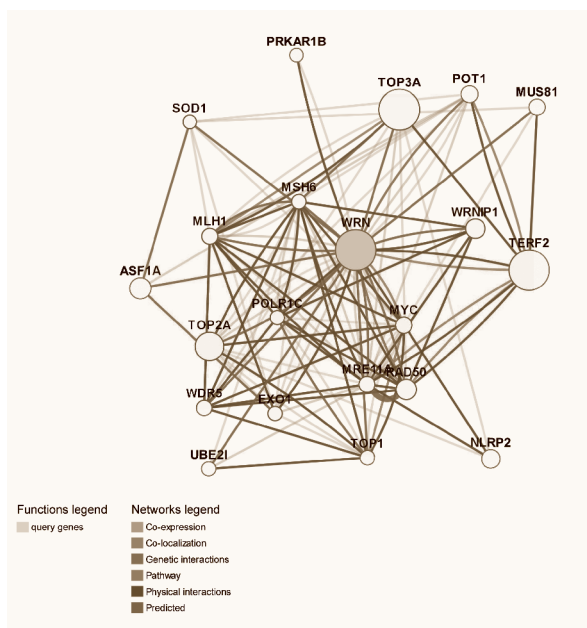


Figura 2. Proteínas incluidas en la red de WRN <http://genemania.org>

La proteína WRN se expresa ubicuamente y puede ser identificada mediante western blot en líneas celulares y muestras de tejido de individuos normales y en cantidad reducida en portadores de mutaciones heterocigotas de copia única en el gen WRN (Kudlow *et al.*, 2007).

Se ha identificado una gran variedad de mutaciones localizadas a lo largo de la región codificante en el gen WRN; sin embargo, muchas de ellas tienen como consecuencia una proteína truncada antes de la señal de localización nuclear, por lo que no puede ser transportada dentro del núcleo para ejecutar sus funciones. Las células de los pacientes con síndrome de Werner presentan reducción de la tasa de proliferación celular asociada a un incremento de la fase S, reducida frecuencia de sitios de iniciación de la replicación y entrada temprana en la senescencia con disminución de la expectativa de vida, así como altos niveles de inestabilidad genómica con incremento de rearrreglos cromosómicos, grandes deleciones espontáneas en el ADN, incapacidad para reparar óptimamente rupturas de doble cadena en el ADN mediante recombinación homóloga y dinámica anormal de los telómeros, los cuales se acortan rápidamente conforme se incrementa la duplicación de la población celular (Goto, 2001; Huang *et al.*, 2006).

Estudios realizados en fibroblastos en modelos de ratones de síndrome de Werner mostraron que los telómeros cortos pueden estimular la activación de WRN, por lo que al estar deficiente, el acortamiento telomérico progresa. Además, en ausencia de la función de WRN, las células acumulan intermediarios de ADN potencialmente tóxicos o telómeros críticamente cortos que propician inestabilidad genómica, mutagénesis, daño al ADN y activación de la vía de apoptosis, con el consecuente compromiso en la estructura y función de órganos y tejidos que al final pueden conducir a senescencia y proliferación celular neoplásica dependiente de acumulación de mutaciones (Kudlow *et al.*, 2007).

El estudio del proceso de envejecimiento mediante el uso de modelos de envejecimiento prematuro en humanos –tales como el estudio de pacientes y células derivadas de pacientes o de animales con HGPS y/o síndrome de Werner– ha sugerido que ambos síndromes

pueden representar una forma prematura o acelerada del envejecimiento; sin embargo, también se han identificado claras diferencias en la naturaleza y magnitud de las manifestaciones clínicas en pacientes con estos síndromes con respecto a individuos que envejecen normalmente (Kippling *et al.*, 2004; Raska, 2010).

El estudio de estos modelos ha confirmado que el envejecimiento ocurre por dos mecanismos importantes: acortamiento telomérico y daño al ADN. En el envejecimiento dependiente del telómero, el acortamiento del telómero y su disfunción conducen a activación de la respuesta al daño a ADN con la inducción de senescencia celular. En el envejecimiento dependiente del daño al ADN, el ADN alterado se acumula por deficiencia en los procesos de reparación, produciendo inestabilidad genómica y senescencia celular acelerada. Ambos mecanismos presentan relación dependiente del estado de p53 (Ding y Shen, 2008).

Por otro lado, puede considerarse a los síndromes de envejecimiento prematuro como fenocopias que pueden aportar datos útiles sobre los mecanismos que subyacen al proceso de envejecimiento (Capell *et al.*, 2009), de tal manera que la identificación de redes, vías moleculares y genes que participan en estos modelos puedan ser utilizados para determinar su participación en el envejecimiento normal (Ramírez *et al.*, 2007) no sólo a través de la búsqueda de mutaciones, sino también de polimorfismos que pudieran estar relacionados con el incremento en la longevidad.

1. Domínguez-Gerpe L, Araújo-Vilar D. Prematurely aged children: Molecular alterations leading Hutchinson-Gilford Progeria and Werner Syndromes. *Curr Aging Sci*, 2008;1(3):202-212.
2. Martin GM. Genetic syndromes in man with potential relevance to the pathobiology of aging. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 1978;14(1):5-39.
3. Longo VD, Finch CE. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science*, 2003;299(5611):1342-1346.
4. Kudlow BA, Kennedy BK, Monnat RJ Jr. Werner and Hutchinson-Gilford progeria syndromes: mechanistic basis of human progeroid diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007;8(5):394-404.
5. Hutchinson J. Case of congenital absence of hair, with atrophic condition of the skin and its appendages, in a boy whose mother had been almost wholly bald from alopecia areata from the age of six. *Lancet I*:1886;923-only.
6. Gilford H. Ateleiosis and progeria: continuous youth and premature old age. *Brit Med J*, 1904;2:914-918.
7. Eriksson M, Brown WT, Gordon, LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 2003;423:293-298.
8. Cao H, Hegele RA. LMNA is mutated in Hutchinson-Gilford progeria (MIM 176670) but not in Wiedemann-Rautenstrauch progeroid syndrome (MIM 264090). *J Hum Genet* 2003;48:271-274.
9. Gabr M, Hashem N, Hashem M, Fahmi A, Safouh M. Progeria, a pathologic study. *J Pediat*, 1960;57:70-77.
10. Erecinski K, Bittel-Dobrzynska N, Mostowiec S. Zespół progerii u dwoch braci. *Pol Tyg. Lek*, 1961;16:806-809.
11. Maciel AT. Evidence for autosomal recessive inheritance of progeria (Hutchinson Gilford). *Am J Med Genet*, 1988;31:483-487.
12. Khalifa MM. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: report of a Libyan family and evidence of autosomal recessive inheritance. *Clin Genet*, 1989;35:125-132.
13. Verstraeten VLRM, Broers JLV, van Steensel MAM, Zinn-Justin S, Ramaekers FCS, Steijlen PM, Kamps M, Kuijpers HJH, Merckx D, Smeets HJM, Hennekam RCM, Marcelis CLM, van den Wijngaard A. Compound heterozygosity for mutations in LMNA causes a progeria syndrome without prelamin A accumulation. *Hum Molec Genet*, 2006;15:2509-2522.
14. Brown WT, Zebrower M, Kieras FJ. Progeria, a model disease for the study of accelerated aging. *Basic Life Sci*, 1985;35:375-396.
15. OMIM: <http://omim.org/clinicalSynopsis/176670?search=Progeria%20Hutchinson-Gilford&highlight=hutchinsongilford%20progeria> Consultado el 4 de octubre de 2011.

16. Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL. The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005;6(1):21-31.
17. Hutchinson CJ. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002;3(11):848-858.
18. Vergnes L, Peterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004;101:10428-10433.
19. Weber K, Plessmann U, Traub P. Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor, implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett*, 1989;257:411-414.
20. Pendas AM, Zhou Z, Cadinanos J, Freije JM, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodríguez F, Tryggvason K, López-Otín C. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet*, 2002;31:94-99.
21. De Sandre-Givannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, Lévy N. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*, 2003;300:2055.
22. Csoka AB, Cao H, Sammak PJ, Constantinescu D, Schatten GP, Hegele RA. Novel lamin A/C gene (LMNA) mutations in atypical progeroid syndromes. *J Med Genet*, 2004;41:304-308.
23. Cox LS, Faragher RG. From old organisms to new molecules: integrative biology and therapeutic targets in accelerated human ageing. *Cell Mol Life Sci*, 2007;64:2620-2641.
24. Young SG, Meta M, Yang SH and Fong LG. Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J Biol Chem*, 2006;281:39741-39745.
25. Cao K, Capell BC, Erdos MR, Djabali K and Collins FS. A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson-Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007;104:4949-4954.
26. Dechat T, Shimi T, Adam SA, Rusinol AE, Andres DA, Spielmann HP, Sinensky MS, Goldman RD. Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007;104:4955-4960.
27. Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, Gordon LB, Der CJ, Cox AD, Collins FS. Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005;102:12879-12884.
28. Fong LG, Ng JK, Lammerding J, Vickers TA, Meta M, Cote N, Gavino B, Qiao X, Chang SY, Young SR, Yang SH, Stewart CL, Lee RT, Bennett CF, Bergo MO, Young SG. Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *J Clin Invest*, 2006;116:743-752.
29. Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, Collins FS. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004;101:8963-8968.
30. Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB and Hutchinson CJ. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev*, 2006;86:967-1008.
31. Toth JI, Yang SH, Qiao X, Beigneux AP, Gelb MH, Moulson CL, Miner JH, Young SG, Fong LG. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005;102:12873-12878.
32. Werner O. in *Werner's Syndrome and Human Aging* (eds. Salk D, Fujiwara Y. & Martin GM). Nueva York: Plenum Press, 1985, 1-14.
33. Brown AD, Claybon AB, Bishop AJR. Mouse WRN Helicase domain is not required for spontaneous homologous recombination-mediated DNA deletion. *Journal of Nucleic Acids*, 2010;2010:pii356917.
34. Goto M. Clinical characteristics of Werner syndrome and other premature aging syndromes: pattern of aging in progeroid syndromes. *Gann. Monograph. Cancer Res*, 2001;49:27-39.
35. Huang S, Lee L, Hanson NB, Lenaerts C, Hoehn H, Poot M, Rubin CD, Chen DF, Yang CC, Juch H, Dorn T, Spiegel R, Oral EA, Abid M, Battisti C, Lucci-Cordisco E, Neri G, Steed EH, Kidd A, Isley W, Showalter D, Vittone JL, Konstantinow A, Ring J, Meyer P, Wenger SL, von Herbay A, Wollina U, Schuelke M, Huizenga CR, Leistriz DF, Martin GM, Mian IS, Oshima J. The spectrum of WRN mutations in Werner syndrome patients. *Hum. Mutat*, 2006;27:558-567.



36. OMIM: <http://omim.org/clinicalSynopsis/277700?search=werner&highlight=werner>  
Consultado el 4 de octubre de 2011.
37. Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*, 1996;272:258-262.
38. Moser MJ, Kamath-Loeb AS, Jacob JE, Bennett SE, Oshima J, Monnat RJ Jr. WRN helicase expression in Werner syndrome cell lines. *Nucleic Acids Res*, 2000;28:648-654.
39. Mushegian AR, Basset DE Jr, Boguski MS, Bork P, Koonin EV. Positionally cloned human disease genes: patterns of evolutionary conservation and functional motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997;94:5831-5836.
40. Gray MD, Shen JC, Kamath-Loeb AS, Blank A, Sopher BL, Martin GM, Oshima J, Loeb LA. The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet*, 1997;17:100-103.
41. Huang S, Li B, Gray MD, Oshima J, Mian IS, Campisi J. The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease. *Nature Genet*, 1998;20:114-116.
42. Huang S, Beresten S, Li B, Oshima J, Ellis NA, Campisi J. Characterization of the human and mouse WRN 3'→5' exonuclease. *Nucleic Acids Res*, 2000;28:2396-2405.
43. Machwe A, Xiao L, Groden J, Matson SW, Orren DK. RecQ family members combine strand pairing and unwinding activities to catalyze strand exchange. *J Biol Chem*, 2005;280:23397-23407.
44. Shen JC, Loeb LA. Werner syndrome exonuclease catalyzes structure dependent degradation of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000;28:3260-3268.
45. Brosh RM Jr, Bohr VA. Roles of the Werner syndrome protein in pathways required for maintenance of genome stability. *Exp Gerontol*, 2002;37:491-506.
46. Ding Shian-ling, Shen Chen-Yang. *Clinical Interventions in Aging*. 2008; 3(3):431-444.
47. Capell BC, Tloutan BE, Orlow SJ. From the rarest to the most common: Insights from progeroid syndromes into skin cancer and aging. *Journal of Investigative Dermatology*, 2009;129:2340-2350.
48. Ramírez CLJ, Cadiñanos I, Varela JMPF, López-Otín C. Human progeroid syndromes, aging and cancer: new genetic and epigenetic insights into old questions. *Cell Mol Life Sci*, 2007;64:155-170.
49. Kipling D, Davis T, Ostler EL, Faragher RGA. What can progeroid syndromes tell us about human aging? *Science*, 2004;305:1426.
50. Raska I. Importance of molecular cell biology investigations in human medicine in the story of the Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Interdis Toxicol*, 2010;3(3):89-93.

Ver página 29.



**Ana Claudia Velázquez Wong**

Unidad de Investigación Médica en Genética  
Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico  
Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro  
Social.

[clavewong@yahoo.com.mx](mailto:clavewong@yahoo.com.mx)

En este capítulo se discutirá el tema del envejecimiento en humanos y su asociación con la inestabilidad cromosómica. Se mencionarán algunos de los mecanismos asociados al envejecimiento celular y el papel de las aberraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales, que se han observado con más frecuencia en individuos de edad avanzada. También se revisarán algunos de los métodos utilizados para la identificación de dichas alteraciones en los cromosomas, incluyendo técnicas de citogenética clásica como las bandas GTG y técnicas de citogenética molecular como la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Se discute también el papel del acortamiento de telómeros en el envejecimiento, así como la aplicación de la prueba de FISH para su evaluación. También se describirá la técnica de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN) y su importancia como biomarcador del envejecimiento y de genotoxicidad.

### Efectos del envejecimiento

¿Qué es el envejecimiento? ¿Por qué y cómo envejecemos? Existen varias teorías que intentan explicar estas interrogantes. El envejecimiento es un proceso complejo y dinámico que afecta cada nivel del organismo. Por lo tanto, es imposible que una sola teoría pudiera explicar este proceso tan complicado. Actualmente existen dos categorías para clasificar las teorías sobre las causas del envejecimiento: 1) Las que apoyan un envejecimiento programado dirigido y, 2) las teorías estocásticas.

En general se considera que los efectos del envejecimiento son una combinación de procesos genéticamente programados y alteraciones genéticas inducidas por factores endógenos y exógenos, que tienen lugar a nivel celular (Semsei, 2000; Wojda y Witt, 2003). Estos procesos generan una inestabilidad genética, la cual podría ser una de las principales causas para la senescencia celular y también podría estar asociada con el cáncer, enfermedades del sistema inmune, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas asociadas con la edad (Bolognesi *et al.*, 1999; Cutler, 1992).

El ADN de nuestras células está continuamente bajo la

amenaza de mutaciones, que ocurren mediante una variedad de mecanismos que incluyen mutaciones puntuales, radicales libres, rompimientos y rearreglos cromosómicos, pérdida o ganancia de cromosomas, silenciamiento de genes debido a una metilación inapropiada de CpG en las secuencias promotoras, así como un acortamiento acelerado de los telómeros y desregulación de la apoptosis (Fenech, 1998; Fenech, 2002; Wojda y Witt, 2003). Este conjunto de procesos, asociado a la ineficiente o incorrecta capacidad de reparación del ADN, aceleran el envejecimiento celular, pues cuando el daño al genoma excede la capacidad de reparación de la célula pueden ocurrir cambios fundamentales en el código genético y en la expresión génica, lo que puede causar daños severos en el desarrollo, función celular y fisiología de los tejidos, acelerando el envejecimiento y propiciando la pérdida de la capacidad de regeneración celular (Fenech, 2010).

El proceso general de la senescencia celular se denomina senescencia replicativa, en contraste con el proceso de envejecimiento del organismo. La senescencia replicativa limita la proliferación de las células humanas normales, detiene el crecimiento de manera irreversible y afecta la función celular (Guarente, 1996). Citogenéticamente, el envejecimiento celular está asociado con cambios celulares importantes, donde se incluyen arresto del ciclo celular, tamaño celular aumentado y/o heterogéneo y una frecuencia elevada de células con aberraciones cromosómicas (Wojda *et al.*, 2006). Varios estudios han demostrado que las anomalías cromosómicas, incluyendo la frecuencia de micronúcleos, aumentan progresivamente con la edad en las células somáticas (Fenech, 1998; Bonassi *et al.*, 2001). El envejecimiento acelerado y los síndromes con propensión al cáncer –tales como progeria, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi y síndrome de Werner– presentan una gran inestabilidad cromosómica y/o un acelerado acortamiento de telómeros debido a defectos en varios genes esenciales para la reparación de ADN y mantenimiento de los telómeros, tales como ATM, PARP, BRCA1, BRCA2 y ADN helicasas (Thompson y Schild, 2002; Lansdorp, 2008).

También es interesante el hecho de que las enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, presenten frecuencias mucho más altas de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica (Migliore *et al.*, 1999; Migliore *et*

*al.*, 2001). En el caso de la enfermedad de Alzheimer, existe también evidencia de que la frecuencia de células con trisomía 21 es elevada, lo que lleva a la hipótesis de que estos pacientes podrían ser mosaicos para el fenotipo del síndrome de Down, el cual está asociado con un envejecimiento acelerado y un incremento del riesgo para enfermedades neurodegenerativas (Migliore *et al.*, 1999). En este capítulo nos enfocaremos a las alteraciones cromosómicas asociadas a la edad y a los métodos que se emplean para evaluar la frecuencia de las mismas. También se revisará el acortamiento de telómeros, su papel en el envejecimiento y las estrategias para la evaluación de dicho proceso.

### **Aberraciones cromosómicas y envejecimiento**

Las aberraciones cromosómicas (AC) son cambios en la estructura o número de los cromosomas y pueden ser inducidos u ocurrir de forma espontánea durante el ciclo celular (Pfeiffer *et al.*, 2000). Como se ha mencionado anteriormente, las AC están fuertemente asociadas con el envejecimiento, aunque no está muy claro si éstas son parte de la causa o una consecuencia del envejecimiento. El daño cromosómico puede evaluarse fácilmente mediante el estudio de AC, como las translocaciones, fragmentos acéntricos, cromosomas dicéntricos, cromosomas en anillo, rompimientos cromatídicos o cromosómicos, acortamiento de telómeros, pérdida o ganancia de cromosomas (aneuploidía) y formación de micronúcleos, cuya frecuencia se ha observado que aumenta progresivamente con la edad (Davidovic, 1995; Fenech, 1998; Bolognesi *et al.*, 1999; Wojda *et al.*, 2006; Erceg *et al.*, 2007).

Las células deficientes en reparación pueden acumular más daño al ADN, lo que a nivel citogenético se refleja en un aumento en la frecuencia de AC con la edad (Ramsey *et al.*, 1995). Estudios citogenéticos realizados en células senescentes de adultos mayores han mostrado un aumento en la frecuencia de AC (Bolognesi *et al.*, 1999; Wojda *et al.*, 2006). Otro estudio realizado en linfocitos de adultos mayores demostró un número elevado de cromosomas dicéntricos y en anillo, lo que sugiere un gran daño en el ADN (Davidovic, 1995). Por lo tanto, las AC en linfocitos de sangre periférica se consideran como uno de los mejores indicadores para la detección de senescencia celular (Wojda y Witt, 2003).

Las aberraciones numéricas se refieren a cambios en el número normal de cromosomas (aneuploidía, poliploidía), las cuales ocurren debido a una segregación anormal. Algunos estudios han mostrado un aumento significativo de pérdidas cromosómicas en linfocitos y fibroblastos tanto de mujeres como de varones de edad avanzada, donde se involucra con mayor frecuencia al cromosoma X en las mujeres y al cromosoma Y en los varones (Nowinsky *et al.*, 1990; Cottliar, 2001; Wojda *et al.*, 2006). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que la pérdida o ganancia de cromosomas no es necesariamente una función del género y la edad (Nowinsky *et al.*, 1990; Hando *et al.*, 1994; Guttenbach *et al.*, 1995). Pero la aneuploidía se ha visto con mayor frecuencia en mujeres de edad avanzada que en varones de la misma edad (Nowinski *et al.*, 1990; Wojda *et al.*, 2007). Por otra parte, estudios realizados en células espermáticas de varones en edad avanzada muestran un efecto negativo en las frecuencias de aneuploidía para ciertos cromosomas (Guttenbach *et al.*, 2000; Slotter *et al.*, 2007).

Actualmente, existen diversas herramientas citogenéticas para el estudio de las aberraciones cromosómicas asociadas al envejecimiento, como son las técnicas de citogenética clásica (Bandas GTG) y técnicas de citogenética molecular (FISH). La técnica de micronúcleos también se ha aplicado al estudio del envejecimiento.

### **Acortamiento de telómeros**

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas que cubren los extremos de los cromosomas. La integridad de la estructura telomérica y su secuencia en hexámero de repetidos TTAGGG en su ADN es crítica para proteger los extremos de los cromosomas de la degradación y para mantener la estabilidad genómica total (Blackburn, 1991; De Lange, 2005). El número de repetidos TTAGGG se reduce durante cada división celular y, como consecuencia, la longitud del telómero disminuye en la mayor parte de las células diferenciadas durante la vida del individuo (Blackburn, 1991).

El acortamiento de los telómeros puede ocasionar que se fusionen los extremos teloméricos y, como consecuencia, que se presente una gran inestabilidad cromosómica, la cual es un evento de iniciación clave de numerosas neoplasias, que incluyen cáncer de pulmón, de mama,

de colon, cerebro, próstata y ciertos tipos de leucemias (Plentz *et al.*, 2003; Sieglóva *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2008; Mehdi-pour *et al.*, 2011). Se ha demostrado que el acortamiento de telómeros puede acelerarse por factores ambientales como el estrés psicológico y fisiológico, el tabaquismo, la obesidad y homocisteína plasmática elevada (Epel *et al.*, 2004; Morla *et al.*, 2006; Richards *et al.*, 2008; Zannolli *et al.*, 2008; Bull *et al.*, 2009). Este proceso es muy evidente en poblaciones de edad avanzada (Kimura *et al.*, 2007). La técnica de FISH es de gran utilidad en el estudio del acortamiento de telómeros (Canela *et al.*, 2007).

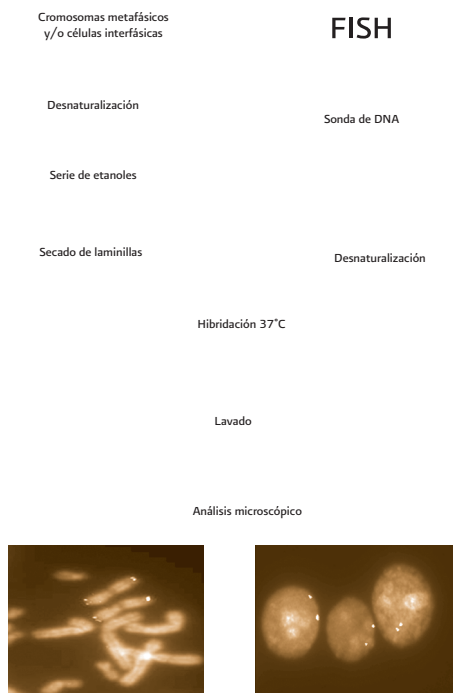
### Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

La prueba de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se ha convertido en una poderosa herramienta para explorar los genomas a nivel de cromosomas. El procedimiento se puede utilizar para identificar cromosomas individuales, rearrreglos entre cromosomas y para localizar secuencias específicas de ADN en cromosomas metafásicos o células interfásicas tales como centrómeros, telómeros y genes individuales (Williams *et al.*, 2011). La técnica permite también identificar tanto aberraciones numéricas como estructurales. La prueba consiste en hibridar, bajo condiciones apropiadas, una sonda de ADN marcada fluorescentemente con su secuencia complementaria,

sobre preparaciones de cromosomas y/o núcleos interfásicos. Al final, las sondas y la región de estudio son visualizadas *in situ* con un microscopio de fluorescencia. Con esta prueba se puede determinar si una secuencia particular de ADN está presente en una célula, en qué cromosoma se encuentra, y cómo está localizada en relación con otras secuencias marcadas sobre el mismo cromosoma. Actualmente la prueba de FISH se utiliza para mapeo de cDNA, análisis de aneuploidía, rearrreglos cromosómicos, identificación de cromosomas marcadores, acortamiento de telómeros, detección de daños inducidos *in vitro* e *in vivo* por agentes físicos y químicos, entre otros (Natarajan, 2001; García-Sagredo, 2008; Aubert y Lansdorp, 2008). Las principales ventajas de FISH incluyen una alta sensibilidad, una relativa facilidad de realización y el gran número de metafases y/o núcleos interfásicos que se pueden analizar en un corto tiempo.

### Micronúcleos

Durante el ciclo celular, el ADN se replica y divide equitativamente formando dos células hijas idénticas. Sin embargo, pueden presentarse errores en la replicación y división del ADN, produciendo pérdida cromosómica y, por lo tanto, un reparto del material genético no equitativo. Evidencia de esto son los micronúcleos (MN) que se originan en las células en división a partir de fragmentos acéntricos cromosómicos o cromatídicos, o de cromosomas o cromátides completas que se rezagan en la anafase durante la división celular, y no son incluidos en los núcleos de las células hijas durante la telofase (Fenech y Morley, 1985). Los MN se originan por una excesiva exposición a agentes que dañan los cromosomas, por defectos en la mitosis y/o defectos en la reparación del ADN (Holland *et al.*, 2008). Varios estudios han demostrado que las frecuencias de MN aumentan con la edad en los adultos, y que las mujeres tienen frecuencias mayores que los hombres (Fenech *et al.*, 1994; Guttenbach *et al.*, 1994; Hagmar *et al.*, 1994; Bonassi *et al.*, 2001, Kazymirová *et al.*, 2009). La prueba de MN se ha convertido en uno de los métodos citogenéticos preferidos para evaluar el daño en el ADN a nivel cromosómico y se ha utilizado como un importante biomarcador del envejecimiento (Fenech, 2005; Fenech *et al.*, 2011). Esta técnica permite medir tanto rompimientos cromosómicos como pérdidas cromosómicas (Fenech, 2000) y, a diferencia del análisis de metafases, representa un método alternativo de evaluación a corto plazo y más sencillo. La frecuencia de



MN se puede medir fácilmente en cultivos de linfocitos, eritrocitos o células epiteliales exfoliadas (bucal, urotelial, nasal) (Fenech *et al.*, 2008). Los MN son expresados solamente en células en división y se analizan 500 células binucleadas.

### **Técnica de micronúcleos**

A los cultivos celulares se les agrega citocalasina-B, un inhibidor del huso mitótico que evita la citocinesis, a cierto tiempo de iniciado el cultivo, lo que permite reconocer células que han completado una división nuclear por su apariencia binucleada. Se cosechan después agregando solución hipotónica de KCl y posteriormente se fijan en solución Carnoy. Las células fijadas son goteadas en laminillas, se dejan secar al aire y se tiñen con una solución del colorante Giemsa. La frecuencia de micronúcleos se determina en linfocitos binucleados. Los criterios de lectura para células binucleadas y MN se basan en los criterios establecidos por Fenech y colaboradores (2003).

La prueba de MN que bloquea la citocinesis (CBMN por sus siglas en inglés) tiene una gran precisión porque los datos obtenidos no son afectados por la cinética de división celular alterada. Este método permite medir la inestabilidad cromosómica, la capacidad de reparación del ADN, la tasa de división nuclear, la respuesta mitogénica y la presencia de células necróticas y apoptóticas. Se utiliza ampliamente en estudios de genotoxicidad y para biomonitorizar poblaciones en riesgo.

### **Microsatélites**

El estudio de microsatélites se ha convertido en una de las pruebas más populares de marcadores genéticos. Los microsatélites son secuencias cortas de ADN en las que un tramo de 1 a 6 pb está repetido en tándem. Estas secuencias pueden diferir en el número de repeticiones entre los individuos. Gracias al uso de la PCR, los microsatélites se han convertido en un importante marcador genético, especialmente en pruebas de paternidad. Los microsatélites están involucrados en muchas enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento (Schlötterer, 2000).

1. Aubert G, Lansdorp M. Telomeres and aging, 2008 Apr;88(2):557-79.
2. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*, 1991;350(6319):569-573.
3. Bolognesi C, Lando C, Forni A, Landini E, Scarpato R, Migliore L, Bonassi S. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age Ageing*, 1999;28:393-397.
4. Bonassi, S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hrelia P, Krishnaja AP, Lee TK, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Müller WU, Odagiri Y, Scarffi MR, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A. Human Micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Env Mol Mutagen*, 2001;37(1):31-45.
5. Bull CF, O'Callaghan NJ, Mayrhofer G, Fenech MF. Telomere length in lymphocytes of older South Australian men may be inversely associated with plasma homocysteine. *Rejuvenation research*, 2009;12(5):341-349.
6. Campisi, J. Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* 1996; 84:497-500.
7. Canela A, Vera E, Klatt P and Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007;104(13):5300-5305.
8. Catalan, J, Auto K, Wessman M, Lindholm C, Knuutila MS, Sorsa M, Norppa H. Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. *Cytogenet Cell Genet*,1995;68:11-16.
9. Cottliar, ASH, Slavutsky IR. Telomeres and telomerase activity. Their role in senescence and in neoplastic development. *Med. Buenos Aires*, 2001;61:335-342.
10. Cutler RG. Genetic stability and oxidative stress: common mechanisms in aging and cancer. *EXS*, 1992;62, 31-46.
11. Davidovic, M. Chromosome changes in old age. In *Age vault: an INIA collaborating network anthology*

- (ed. S. Formosa), Valletta, Malta: International Institutes of Ageing (United Nations), 1995;235-241.
12. De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes y development*, 2005;19(18):2100–2110.
  13. Erceg P, Milosevic DP, Despotovic N, Davidovic M. Chromosomal changes in ageing. *J Genet*, 2007;86(3):277-278.
  14. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004;101(49):17312–17315.
  15. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*, 1985;147:29-36.
  16. Fenech M, Neville S, Rinaldi J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleous frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutat Res*, 1994;313(2-3):203-7.
  17. Fenech M. Chromosomal damage rate, aging, and diet. *Ann N Y Acad Sci*, 1998;854:23–36.
  18. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, 2000;455(1-2):81-95.
  19. Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer, *Drug Discov Today*, 2002;7(22):1128-1137.
  20. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUman Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*, 2003;534(1-2):65-75.
  21. Fenech M. The genome health clinic and genome health nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis*, 2005;20(4):255-269.
  22. Fenech M, Baghurst P, Luderer W, Turner J, Record S, Ceppi M, Bonassi S. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability– results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis*, 2005;26(5):991-9.
  23. Fenech, M. Folate, DNA damage and the aging brain. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2010;131:236-241.
  24. Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, Bolognesi C, Knasmueller S, Kirsch-Volders M, Bonassi S. The HUMN and HUMNxL International collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells–past, present and future. *Mutagenesis*, 2011;26(1):239-45.
  25. Garcia-Sagredo JM. Fifty years of cytogenetics: a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochim Biophys Acta*, 2008;1779(6-7):363-75.
  26. Guarente L. Do changes in chromosomes cause aging? *Cell*, 1996;86:9-12.
  27. Guttenbach M, Schakowski R, Schmid M. Aneuploidy and ageing: sex chromosome exclusions into micronuclei. *Hum Genet*, 1994;94:295-8.
  28. Guttenbach M, Koschorz B, Bernthaler U, Grimm T, Schmid M. Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *Am J Hum Genet*, 1995;57:1143-1150.
  29. Guttenbach M, Köhn FM, Egel W, Schmid M. Meiotic nondisjunction of chromosomes 1, 17, 18, X and Y in men more than 80 years of age. *Biol. Reprod*, 2000;63(6):1727-1729.
  30. Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Högstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I, Reuterwall, Salomaa S, Skerfving S, Sorsa M. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res*, 1994;54(11):2919-22.
  31. Hando J, Nath J, Tucker J. Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosome*, 1994;103:186-193.
  32. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*, 2008;659:93–108.
  33. Jang JS, Choi YY, Lee WK, Choi JE, Cha SI, Kim YJ, Kim CH, Kam S, Jung TH, Park JY. Telomere length and the risk of lung cancer. *Cancer science*, 2008;99(7):1385–1389.
  34. Kazimirová A, Barancoková M, Dzupinková Z, Wsóllová L, Dusinká M. Micronuclei and chromosomal



- aberrations, important markers of ageing: possible association with XPC and XPD polymorphisms. *Mutat Res*, 2009;661:35-40.
35. Kimura M, Barbieri M, Gardner JP. Leukocytes of exceptionally old persons display ultra-short telomeres. *Am J Physiol*, 2007;293(6):2210.
  36. Lansdorp PM. Telomeres, stem cells, and hematology. *Blood*, 2008;111(4):1759-66.
  37. Mehdipour P, Kheirollahi M, Mehrazin M, Kamalian N, Atri M. Evolutionary hypothesis of telomere length in primary breast cancer- and brain tumor- patients: A tracer for Genomic-tumor heterogeneity and instability. *Cell Biol Int*, 2011 Mar 8. [Epub ahead of print].
  38. Migliore L, Botto N, Scarpato R, Petrozzi L, Cipriani G, Bonuccelli U. Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients. *Cytogenet Cell Genet*, 1999;87(1-2):41-6.
  39. Migliore L, Scarpato R, Coppede F, Petrozzi L, Bonuccelli U, Rodilla V. Chromosome and oxidative damage biomarkers in lymphocytes of Parkinson's disease patients. *Int J Hyg Environ Health*, 2001;204(1):61-6.
  40. Morla M, Busquets X, Pons J, Sauleda J, MacNee W, Agusti AG. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J*, 2006;27(3):525-528.
  41. Natarajan AT. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in genetic toxicology. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2001;20(4):293-298.
  42. Nowinski GP, Van Dyke DL, Tilley BC, Jacobsen G, Babu VR, Worsham MJ, Wilson GN, Weiss L. The frequency of aneuploidy in cultured lymphocytes is correlated with age and gender but not with reproductive history. *Am J Hum Genet*, 1990;46(6):1101-1111.
  43. Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 2000;15:289-302.
  44. Plentz RR, Wiemann SU, Flemming P, Meier PN, Kubicka S, Kreipe H, Manns MP, Rudolph KL. Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer. *Gut*, 2003;52(9):1304-1307
  45. Ramsey MJ, DH Moore, JF Briner, DA Lee, LA Olsen, JR Senft, JD Tucker. The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mutat Res*, 1995;338:95-106
  46. Richards JB, Valdes AM, Gardner JP, Kato BS, Siva A, Kimura M, Lu X, Brown MJ, Aviv A, Spector TD. Homocysteine levels and leukocyte telomere length. *Atherosclerosis*, 2008;200(2):271-277.
  47. Schlötterer C. Evolutionary dynamics of Microsatellite DNA. *Chromosoma*, 2000;109(6):365-71.
  48. Semsei, I. On the nature of aging. *Mech Ageing Dev*, 2000;117(1-3):93-108.
  49. Sieglova Z, Zilovcova S, Cermak J, Rihova H, Brezinova D, Dvorakova R, Markova M, Maaloufova J, Sajdova J, Brezinova J. et al., Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leukemia Research*, 2004;28(10):1013-1021.
  50. Slotter, ED, Marchetti F, Eskenazi B, Weldon RH, Nath J, Cabrerros D, Wyrobek AJ. Frequency of human sperm carrying structural aberrations of chromosome 1 increases with advancing age. *Fertil Steril*, 2007;87(5):1077-86
  51. Thompson LH, Schild D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res*, 2002;509(1-2):49-78.
  52. Williams ES, Cornforth MN, Goodwin EH, Bailey SM. CO-FISH, COD-FISH, ReD-FISH, SKY-FISH. *Methods Mol Biol*, 2011;735:113-124.
  53. Wojda A, Witt M. Manifestations of aging at the cytogenetic level. *J Appl Genet*, 2003;44:383-399.
  54. Wojda A, Zietkiewicz E, Mossakowska M, Pawłowski W, Skrzypczak K, Witt M. Correlation between the level of cytogenetic aberrations in cultured human lymphocytes and the age and gender of donors, *J Gerontol*, 2006;61(8):763-772.
  55. Wodja A, Zietkiewicz E, Witt M. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis*, 2007;22(3):195-200.

### **Técnicas de siembra y cosecha de linfocitos de sangre periférica para obtención de cromosomas metafásicos**

El análisis de linfocitos de sangre periférica permite evaluar el daño cromosómico estructural y numérico mediante un cariotipo con bandas GTG. Este método es relativamente sencillo para el estudio de la inestabilidad cromosómica. Las aberraciones cromosómicas representan un importante biomarcador del envejecimiento. Para ello se toman muestras de sangre periférica del paciente con jeringas heparinizadas, las cuales se agregan a tubos de cultivo con medio PB-MAX (Gibco), que contiene L-glutamina, suero fetal bovino y fitohemaglutinina (agente mitogénico) y se incuban por 72 horas. Es importante realizar los cultivos por duplicado. Pasado el tiempo de incubación, se agrega colchicina al cultivo de linfocitos, los tubos se centrifugan y posteriormente las células son sometidas a un choque hipotónico con una solución de KCl 0.075M. Se realiza una fijación con solución fijadora Carnoy (metanol:ácido acético 3:1) y se centrifugan. Se repite dos veces el lavado y, finalmente, se deja el botón celular en un poco de solución fijadora, quedando una suspensión ligeramente opaca de la cual se preparan laminillas y posteriormente se realiza el bandeado cromosómico. Para preparar las laminillas se dejan caer gotas de la suspensión de cromosomas en cada portaobjetos y se dejan secar al aire. Se observan al microscopio para verificar la densidad celular y la dispersión de los cromosomas, con lo que se obtienen laminillas de buena calidad para el análisis cromosómico.

#### **Bandas GTG**

La técnica de bandas GTG es la más utilizada en los laboratorios de citogenética convencional para el análisis cromosómico de rutina. Su nombre se debe a que son bandas G donde se utilizan tripsina y el colorante Giemsa (GTG). Los cromosomas teñidos mediante esta técnica presentan un patrón de bandas claras y oscuras a lo largo de los cromosomas; para esto se emplea un buffer de fosfatos libre de calcio y magnesio Dulbecco (PBS-CMF) y solución de tripsina. Esta solución se prepara fresca y se utiliza a temperatura ambiente. La solución del colorante Giemsa se prepara con agua destilada, buffer de fosfatos y colorante Giemsa. Las laminillas se colocan en la solución de tripsina, se enjuagan con el buffer de

fosfatos y se tiñen posteriormente en la solución del colorante. Las laminillas se enjuagan con agua destilada y se dejan secar al aire; se montan con resina y se coloca un cubreobjetos para analizarlas al microscopio. Se analizan al menos 30 metafases para la identificación de aberraciones cromosómicas.

#### **Técnica de hibridación in situ con fluorescencia**

Aunque existen diversos protocolos para realizar la prueba de FISH, aquí se presenta uno que se utiliza de manera general en los laboratorios de citogenética molecular. Se prepara la mezcla de hibridación que contiene las sondas específicas para las regiones cromosómicas que se desea estudiar, además de una sonda que se utiliza como control. Las laminillas preparadas con cromosomas metafásicos y/o núcleos interfásicos se pasan por una serie de etanol (70%, 85%, y 100%) y se dejan secar al aire, se desnaturalizan en una solución de formamida y temperatura de 75 °C; se dejan secar al aire. La mezcla de hibridación se desnaturaliza también a temperatura de 75 °C y posteriormente se agrega a la laminilla; la preparación se deja hibridar por 72 horas a 37 °C. Finalmente, se lava la laminilla con 2XSSC y se agrega DAPI como contratinción para observar al microscopio de fluorescencia.

#### **Ana Claudia Velázquez Wong**

Licenciada en Biología y maestra en Ciencias (Biología Celular) por la Facultad de Ciencias de la UNAM. Investigadora asociada A, adscrita a la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Experiencia laboral: Citogenética molecular: hibridación in situ con fluorescencia. Llevó a cabo una estancia de investigación en el laboratorio del Dr. Andrew J. Wyrobek, de la División de Biociencias, del Lawrence Livermore National Laboratory, Universidad de California, Livermore, California, EUA, realizando estudios sobre la frecuencia de alteraciones cromosómicas en células germinales de varones expuestos a radioterapia. Publicaciones en: *Genetic Testing*, *Hypertens Res*, *Dis Markers*, *Acta Histochem*.

**Argelia E. Rojas Mayorquín**

Departamento de Investigación Básica.  
Instituto de Geriátría. Secretaría de Salud.  
argelia.rojas@gmail.com

**Verónica Palomera Ávalos**

Departamento de Biología Celular y Molecular.  
Universidad de Guadalajara.  
vpalomera@hotmail.com

**Ana Laura Márquez Aguirre**

Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica.  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología  
y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ).  
lauraqfb@yahoo.com.mx

**Daniel Ortuño Sahagún**

Departamento de Biología Celular y Molecular.  
Universidad de Guadalajara.  
dortuno@cucba.udg.mx

El envejecimiento es un proceso natural, gradual, progresivo e irreversible por el cual el organismo completo se deteriora y que, en muchos casos, conlleva situaciones patológicas que afectan la calidad de vida. A pesar de los esfuerzos realizados hasta el momento, las estrategias profilácticas o terapéuticas en torno al envejecimiento y sus patologías asociadas aún presentan importantes carencias, por lo que resulta necesaria la implementación de aproximaciones experimentales integrales. En este contexto, las ciencias “ómicas” han revolucionado la parsimoniosa aproximación clásica del gen por gen, proporcionando un fuerte impulso a la investigación, tanto para el descubrimiento de nuevas moléculas involucradas en el proceso de envejecimiento, como el de nuevos biomarcadores y drogas de utilidad farmacológica. La aplicación de la genómica, proteómica e incluso la metabolómica permitirá incrementar el conocimiento del origen y desarrollo de los diferentes procesos que encaminan hacia una ineludible consecuencia de la vida: la senescencia, lo que favorecerá el establecimiento de perfiles de diagnóstico específicos y de patrones terapéuticos que apoyarán la mejora de la calidad de vida durante la denominada “tercera edad”. En la presente revisión, se realiza una breve descripción de los principios básicos de dos de las ciencias “ómicas” más relevantes en nuestra época: la genómica y la proteómica, además de analizar cómo son y cómo pueden ser utilizadas estas técnicas como aproximaciones integrales en el estudio del envejecimiento, haciendo énfasis en el análisis de los perfiles de expresión génica obtenidos por microarreglos y en la utilización de la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas, como principales técnicas empleadas.

El envejecimiento se caracteriza por la disminución de múltiples funciones fisiológicas que conllevan a una probabilidad creciente de muerte. Algunos de los cambios físicos más evidentes relacionados con el envejecimiento son la piel arrugada, el pelo encanecido, así como una disminución de la fuerza y el tono muscular. Sin embargo, existen otros cambios menos visibles que pueden afectar la función de diversos órganos, de manera que el envejecimiento puede considerarse como un factor

de riesgo importante para la mayoría de las patologías humanas, principalmente las enfermedades degenerativas y el cáncer (Heather *et al.*, 2011).

A pesar del gran esfuerzo realizado desde el advenimiento e implementación de las metodologías moleculares, es incuestionable que la aproximación “paso a paso” (en la que se estudia un gen o una proteína a la vez, incluso si se estudian sus interacciones) es una aproximación parsimoniosa, por lo que con el fin de lograr un avance sustancial resulta fundamental la implementación de aproximaciones integrales u holísticas. Es en este contexto en el que surgen las ciencias “ómicas” (figura 1), como ciencias biológicas que abordan el estudio de los genes, en el contexto del DNA (genómica) y de sus productos; primeramente el RNA (transcriptoma, que incluye sus diferentes formas, como: RNA heterogéneo nuclear o inmaduro, mRNA formado por ajuste, el tRNA y el rRNA) y, en segundo lugar, las proteínas, a través del estudio de la proteómica (que incluye sus formas modificadas postraduccionales), así como del estudio del grupo de factores asociados a, o derivados de estas tres principales macromoléculas: DNA, RNA y proteínas, que incluye a los metabolitos (metabolómica), a los factores no genéticos (epigenómica) y al estudio del resultado de las posibles combinaciones de todas ellas mediante la fenotípica. Por lo cual es razonable proponer que el amalgamamiento de las áreas de estudio antes mencionadas permitirá eventualmente la comprensión del proceso global de la función, tanto a nivel celular como a nivel de los tejidos y de los órganos, lo que a su vez proporcionará un panorama más amplio y permitirá un mayor conocimiento de los mecanismos del envejecimiento a nivel molecular.

### **Conceptos indispensables para una visión genómica holística**

La genómica aborda el estudio del genoma a nivel de la organización molecular del DNA y del RNA e incluye, entre otros, el estudio de la propia secuencia del DNA y la información que está codificada en ella, tanto en las fases abiertas de lectura de las unidades de transcripción (ORFeómica) como en sus promotores (promoterómica), considerando además modificaciones como metilaciones (metilómica), los RNAs generados (transcriptómica), así como los casos especiales de los gametos (haplómica) y de organelos con su propio DNA, como las mitocondrias y el cloroplasto (mitocondriómica y cloroplastosómica,

# DNA

# RNA

# Proteína

Figura 1. Esquema general del escenario de las ciencias "ómicas". Áreas de análisis holístico de la función celular a nivel molecular.

respectivamente), así como la manifestación de todos estos en el fenotipo (fenotipómica). Además de que se deben tomar en cuenta los factores epigenéticos (epigenómica) capaces de influir sobre el genoma (figura 1). Para una revisión completa de la relación entre los factores epigenéticos y el envejecimiento, consultar el trabajo de Kaliman *et al.* (2011).

Desde un punto de vista integrativo, lo más relevante de la genómica es el establecimiento de los perfiles de expresión génica, mediante los cuales se puede obtener una gran cantidad de información a partir de un grupo de células, un tejido o un órgano, tanto *in vitro* como *in vivo*, bajo ciertas circunstancias o en una etapa particular de su desarrollo. De esta forma, es posible visualizar un panorama más amplio que el que se tendría si únicamente se analizara la expresión de un gen, o de unos cuantos genes, bajo ciertas condiciones mediante una PCR convencional (amplificación de uno o varios fragmentos génicos y su posterior análisis cualitativo por medio de visualización en gel de electroforesis) o incluso mediante una PCR en tiempo real (amplificación de uno o varios fragmentos génicos y su análisis cuantitativo sin necesidad de electroforesis posterior). Sin embargo, una vez que el panorama amplio es obtenido, es necesaria su adecuada confirmación mediante experimentos puntuales, a través de la realización de estas técnicas (PCR convencional o en tiempo real y secuenciación) o incluso mediante la correlación con los niveles de expresión proteica, ya sea por western blot o por inmunocitoquímica.

Cuando el nivel de análisis cambia, el paradigma también lo hace y es necesario modificar, o al menos ajustar, las reglas de análisis que funcionaban para el estudio de forma

individual de los elementos que participan en un nuevo nivel de organización. Lo cual significa que al aumentar el nivel de complejidad de un sistema, el canon de reglas que regían al nivel anterior cambia (teoría de la complejidad). Por lo tanto, la información obtenida por los experimentos de microarreglos debe ser integrada y analizada de forma conjunta, para poder descifrarla, interpretarla y entenderla. Posteriormente, deben realizarse las verificaciones individuales correspondientes, con el propósito de poder profundizar en el análisis de las redes moleculares del funcionamiento celular.

En los estudios de genómica resulta importante enfatizar, por su relevancia implícita, el análisis del transcriptoma, el cual se orienta al estudio del mRNA que es expresado por una población de células, un tejido o un órgano, en cierto momento o bajo ciertas condiciones. Se sabe que el genoma completo de un organismo codifica para una cantidad considerablemente grande de genes; por ejemplo, se calcula que el genoma del gusano (*Caenorhabditis elegans*) contiene en torno a 21,700 genes (Gerstein *et al.*, 2010), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) unos 13,500 (Celniker y Rubin, 2003) y el ratón (*Mus musculus*) o el humano (*Homo sapiens*) entre 20 y 40 mil genes, dependiendo del tipo de cálculo que se haga con base en la información obtenida de las secuencias y contenida en diversas bases de datos (tabla 1).

La aproximación experimental mediante microarreglos es menor o mayormente útil en función del tipo de experimento que se realice. Por ejemplo, se pueden comparar los perfiles de expresión génica de dos poblaciones celulares diferentes mantenidas *in vitro*, o entre la misma población antes y después de un

Tabla 1. Tamaños relativos de los genomas de seres vivos utilizados como modelos biológicos. Modificado del Human Genome Project Information con referencias seleccionadas: <sup>a</sup> Clamp et al., 2007; <sup>b</sup> Hamilton y Frankel, 2001; <sup>c</sup> Celniker y Rubin, 2003; <sup>d</sup> Spannagl et al., 2011; <sup>e</sup> Gerstein et al., 2010. \*Es una cantidad de genes especulativa debido a que las estimaciones involucran imperfecciones derivadas de la dificultad de identificar con absoluta certeza la totalidad de genes. † Las células procariontes no poseen cromosomas, ya que su DNA es circular y no se forman nucleosomas en torno a proteínas histonas.

tratamiento, como la inducción de su diferenciación (Rojas-Mayorquín et al., 2008), o bien comparar un tejido después de un tratamiento versus otro sin tratar (Ortuño-Sahagún et al., 2010), o incluso contrastar un tejido de un organismo de condición mutante contra el fenotipo silvestre (Junyent et al., 2011; Ortuño-Sahagún et al., en preparación). En todos estos casos, la información obtenida por el microarreglo resulta significativa y útil, y proporciona además pistas sólidas relativas a los procesos biológicos involucrados o afectados en las diferentes circunstancias bajo estudio.

El establecimiento del perfil de expresión génica por microarreglos provee una perspectiva cuantitativa de los cambios relativos en los niveles de expresión génica cuando se comparan dos condiciones en un determinado momento o bajo determinadas circunstancias (fisiológicas, patológicas, bajo estrés o tratamiento con fármacos), lo cual permite incrementar sustancialmente el panorama de información y visualizar el estado fisiológico preponderante de las células, tejidos u órganos analizados; sin embargo, esta metodología presenta algunas limitaciones. Cuando se estudia un órgano, los microarreglos no permiten identificar la participación relativa de las diferentes subpoblaciones de fenotipos celulares presentes por separado, ya que se analiza la expresión génica conjunta como un todo. Por otra parte, la comparación cuantitativa de los niveles de expresión para un determinado gen o grupos de genes entre múltiples experimentos es técnicamente muy

difícil (Chudin et al., 2002). Otra limitación importante consiste en la destrucción del tejido u órgano en estudio, ya que requiere de la lisis celular de toda la muestra para la obtención del material genético que será hibridado en las laminillas del chip del microarreglo. Por lo tanto, resulta imprescindible complementar los resultados obtenidos del análisis de microarreglos con una batería de experimentos adecuada que confirme y apoye los perfiles de expresión génica obtenidos.

### Conceptos básicos para una aproximación integral en proteómica

La proteómica incluye el estudio de prácticamente el total de proteínas contenidas en un grupo de células, un tejido, un órgano e incluso en un organismo completo. La cantidad y proporción de dichas proteínas varía en función del estado del desarrollo, la tasa metabólica, el estado fisiológico, y depende también del órgano o tipo de tejido. El principal objetivo de la proteómica es descubrir e identificar los detalles funcionales de la entidad biológica bajo estudio. Se realiza básicamente en cinco etapas en secuencia, tres de las cuales requieren de una constante retroalimentación con las bases de datos (figura 2).

Los estudios de proteómica a gran escala permiten identificar la composición proteica, así como la estructura de las proteínas, sus isoformas presentes, los cambios conformacionales que sufren, las modificaciones postraduccionales que presentan (como fosforilaciones,

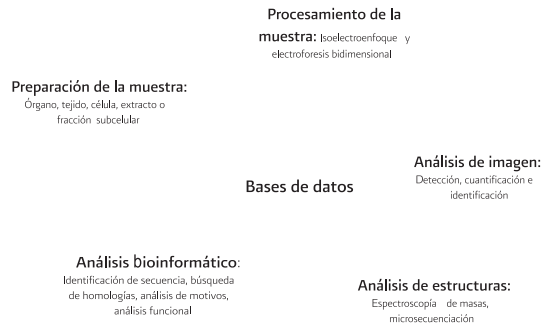


Figura 2. Etapas generales del procesamiento y análisis proteómico.

glicosidaciones, sulfataciones, etcétera) y las interacciones con otras proteínas o con agentes químicos (como drogas, tóxicos, etcétera). A partir de una cantidad de muestra relativamente pequeña, es posible la identificación de una proteína individual entre cientos o miles de otras proteínas. Por todo lo anterior, la proteómica ha cambiado la forma en la cual la investigación biológica se realiza e incluso cómo se plantea. A diferencia de la aproximación parsimoniosa previamente mencionada, la proteómica ha hecho posible ampliar las aproximaciones experimentales, basada en el estudio y análisis de los patrones de expresión de redes moleculares interactivas.

Como parte de la proteómica se han desarrollado diferentes subespecialidades (tabla 2). La proteómica de expresión analiza la expresión de las proteínas celulares mediante técnicas de separación electroforética o cromatográficas, aprovechando la carga neta de las proteínas. La proteómica cuantitativa se encarga de la cuantificación de conjuntos de proteínas. La cartografía celular proteínica (topografía de proteínas) se enfoca en la localización subcelular y las interacciones físicas entre proteínas en diferentes etapas de la función celular. La proteómica química es útil en la determinación de interacciones de proteínas con fármacos o agentes químicos. La proteómica estructural se basa en el análisis tridimensional de las estructuras proteicas y la realización de modelos tridimensionales. La proteómica funcional o proteómica de interacción se aboca a la función y regulación de proteínas específicas, así como de las interacciones proteína-proteína. La proteómica comparativa se enfoca en la comparación de la secuencia de las proteínas entre proteínas homólogas o análogas. Finalmente, la proteómica reversa inicia con el estudio del genoma y, a partir de su secuencia, procede a la

secuencia de las proteínas, generalmente cuando se trata de proteínas “hipotéticas”.

Además de las anteriores –y en relación muy cercana con la proteómica– se encuentra la metabolómica, que estudia el estado metabólico dinámico empleando para ello diferentes metodologías como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear combinada con un análisis estadístico. El estudio de los metabolitos en un momento específico resulta sumamente informativo en relación con el fenotipo del organismo, ya que estas moléculas reflejan en realidad el producto de la transcripción genómica y, más precisamente, reflejan la actividad celular o el fenotipo funcional. Asimismo, los estudios de metabolómica resultan útiles para el diseño de tratamientos farmacológicos individualizados, debido a la posibilidad de predecir el efecto e influencia de ciertas drogas sobre el sistema de una forma específica, una vez que las características de su metabolización han sido establecidas.

### Aproximaciones holistas a nivel molecular para el estudio del envejecimiento

Uno de los objetivos principales de la gerontología es el conocimiento y la comprensión de los mecanismos biológicos involucrados en el envejecimiento, tanto a nivel molecular como celular y orgánico, lo cual haría posible el entendimiento de los mecanismos que subyacen en los procesos patológicos. Debido a las limitaciones del estudio experimental de dicho proceso en humanos, se han empleado diversos modelos en animales; sin embargo, uno de los principales problemas sobreviene al tratar de extrapolar los datos obtenidos de estos modelos al ser humano, debido a la amplia diferencia en cuanto a los periodos de duración de sus ciclos de vida. A pesar de esta limitación, la investigación relativa al envejecimiento se ha acelerado de forma sustancial con la aplicación de las metodologías de análisis global de la expresión génica como son los microarreglos, utilizados para el análisis de los perfiles de expresión génica, y la electroforesis bidimensional seguida de la espectrometría de masas, empleadas para la identificación de proteínas.

### Genómica del envejecimiento

Un enfoque atractivo para estudiar las diferencias moleculares asociadas con el fenómeno del envejecimiento como la inexorable consecuencia de la vida, debido a su

*Tabla 2. Subespecialidades de la proteómica.*



complejidad y a que es influido por diversos factores, es el uso de los microarreglos que permiten escanear todo el genoma y encontrar aquellos genes que cambian su expresión con la edad. Como se mencionó anteriormente, la aproximación genómica tiende a identificar grupos de genes y vías reguladoras involucradas en los procesos biológicos, ofreciendo una alternativa que puede acelerar el conocimiento de los mecanismos implicados en éstos.

Estos estudios llevarán a la identificación de nuevos biomarcadores que pudieran ser utilizados como índices de la edad fisiológica. Para ello, se han generado perfiles transcripcionales de diversos tejidos humanos, incluyendo el cerebro, la sangre, los ojos, el riñón, los músculos y la piel. Los cambios en los niveles de expresión de estos genes pueden tener consecuencias funcionales importantes en el proceso de envejecimiento, por lo que la determinación de los cambios de expresión génica podrá poner de manifiesto aquellos procesos moleculares involucrados en el envejecimiento para cada tejido en particular.

Los experimentos con microarreglos relacionados al estudio del envejecimiento se iniciaron en el año de 1999 (Shelton *et al.*, 1999) y durante la primera década del presente siglo se ha incrementado de forma constante el número de publicaciones indexadas relativas a este aspecto en particular (figura 3). De forma paralela, se ha incrementado significativamente la información de las secuencias de DNA y de RNA en las bases de datos, así como las metodologías informáticas para analizar los datos obtenidos, las cuales han presentado mejoras sustanciales (Klamt *et al.*, 2007). A pesar de todo ello, aún se está lejos de conseguir completar la información referente a la identificación de todas las interacciones entre los diferentes elementos genómicos que establecen y regulan el funcionamiento celular.

Los microarreglos generan información tanto cuantitativa –referida a los genes sobre expresados o cuya expresión disminuye significativamente–, como cualitativa –referida a los niveles relativos de expresión–, la cual en conjunto lleva a evaluar los cambios en la expresión génica comparativos entre dos condiciones determinadas. La aplicación de los microarreglos al estudio del envejecimiento se incrementa cada año y se ha aplicado en diversos modelos animales, desde invertebrados como el *C. elegans* y la *D. melanogaster*, hasta, evidentemente, diversos tejidos

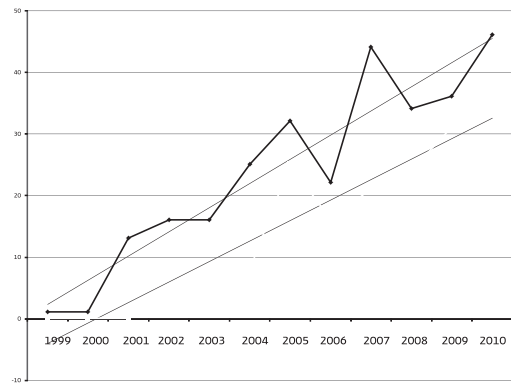


Figura 3. Publicaciones en PubMed de microarreglos o proteómica en estudios relacionados con el envejecimiento. Se consideraron todos los artículos que incluyeron los términos microarray y aging (línea negra) o bien proteomic y aging (línea naranja) en el título o en el resumen. Se incluyeron 304 trabajos de microarreglos entre 1999 y 2010, y de proteómica se incluyeron 179 trabajos en el mismo periodo.

humanos, pasando por una gran cantidad de estudios en roedores (rata y ratón) e incluso otros mamíferos, como perros y monos macacos, sin dejar de lado estudios en protistas unicelulares, como *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), así como otros enfocados al transcriptoma relacionado a un organelo en particular, la mitocondria (véanse tabla 3 y referencias incluidas).

La genómica ha demostrado que existen genes específicos que afectan la tasa de esperanza de vida o el envejecimiento humano. Una forma de encontrar posibles genes relacionados al envejecimiento es la búsqueda de las diferencias genéticas entre los individuos centenarios y los de mediana edad. La mayoría de estos trabajos se han centrado en estudiar genes candidatos (genotipificación por medio de polimorfismos de nucleótido simple o SNPs, por sus siglas en inglés) y no en el análisis de todo su genoma. Aunque se han descrito diversos polimorfismos en individuos longevos, sólo dos de estos genes (FOXO3A y APOE) se han visto asociados consistentemente con la longevidad en diversas poblaciones (Chung *et al.*, 2010). Estos hallazgos son importantes debido a que el estudio de los genes asociados con el envejecimiento puede revelar procesos moleculares relevantes incluso para cada uno de los tejidos afectados por la senescencia celular.

La evaluación de la información genómica relacionada con el envejecimiento presenta algunas limitaciones, en particular las relacionadas con algunos factores capaces de

influir sobre la variabilidad de los resultados obtenidos, por ejemplo, el organismo modelo utilizado (gusanos, insectos, roedores u otros), el órgano, tejido o células utilizadas en el estudio (cerebro, músculo, células aisladas, etcétera), ya que los diferentes tejidos de un organismo envejecen de manera distinta, o bien el uso de mutantes (como el ratón SAMP8 de senescencia acelerada). Sin embargo, tomando en cuenta estos factores, la información obtenida mediante esta aproximación global resulta ciertamente útil en la consecución de un mayor nivel de conocimiento relacionado al proceso del envejecimiento.

### **La proteómica del envejecimiento**

Una de las grandes ventajas de los estudios de proteómica es que la enorme cantidad de información generada por unos pocos experimentos –tal y como también ocurre en los estudios de genómica– puede ser depositada en grandes bases de datos, que además de servir de sitios de almacenamiento para toda esa información, también la procesan, clasifican y organizan, lo que permite su posterior comparación y análisis; eventualmente, esto acelera de forma sustancial el trabajo experimental e incrementa los resultados particulares obtenidos en el estudio del envejecimiento.

Diversos estudios se han realizado en torno a la proteómica del envejecimiento (tabla 4 y referencias incluidas), dirigidos tanto a células y tejidos humanos, como mediante el uso de especies modelo; como el gusano (*C. elegans*), la abeja (*Apis mellifera*), roedores (*M. musculus* y *Rattus norvegicus*), aves (*Gallus domesticus*), e incluso la levadura (protista unicelular *S. cerevisiae*). Otros están enfocados a diversos tejidos en particular, entre los que destacan el neural, muscular y epitelial. Con relación a los estudios de la metabolómica del envejecimiento, los esfuerzos se han centrado en la búsqueda de marcadores del envejecimiento celular.

### **Bases de datos relativas al estudio del envejecimiento a nivel molecular**

Desde el mes de octubre de 2001 y hasta septiembre de 2006 estuvo en funcionamiento una base de datos que albergaba información relativa a la biología del envejecimiento: SAGE KE (Science of Aging Knowledge Environment: <http://sageke.sciencemag.org>) y que aún es accesible, pues la información ha sido albergada por la revista *Science*. Una nueva versión de esta base de datos se

localiza en la Universidad de Washington (<http://www.uwaging.org/>). Otras páginas web existentes son Science of aging, que se localiza en: <http://sageweb.org/>; y Human Ageing Genomic Resources, accesible en: <http://genomics.senescence.info/>; ambas son colecciones de bases de datos y herramientas diseñadas para apoyar la investigación y el estudio de la biología y la genética del envejecimiento humano, empleando para ello una gran variedad de aproximaciones genómicas.

Resulta evidente que el mero hecho de identificar toda la secuencia genómica de un organismo, o de conocer todas las isoformas y modificaciones de sus productos (proteínas), no es suficiente para dilucidar los mecanismos del proceso de envejecimiento. Es necesario integrar toda esa información de una manera funcional que refleje de forma más precisa la situación real mediante la biología de sistemas (Hood, 2003). Por lo tanto, tan importante es generar toda la información de las ciencias “ómicas”, como desarrollar los instrumentos capaces de analizar y ponderar eficientemente toda esa información. A este respecto, la bioinformática y la biología computacional se han dedicado recientemente a realizar este tipo de análisis; ambas áreas están basadas en la biología de sistemas, es decir, en la construcción de las redes de interacción de genes, de sus productos (proteínas) y de las vías metabólicas que interactúan para constituir módulos funcionales. Estos módulos, a su vez, integran el diseño de modelos que buscan predecir fenotipos clínicos para el diseño de estrategias diagnósticas y terapéuticas, luego de que la experimentación genera resultados, tendiendo hacia una medicina personalizada y hacia el entendimiento de los misterios del envejecimiento.

*Tabla 3. Estudios de análisis de expresión génica en el envejecimiento mediante microarreglos.*

*Tabla 4. Estudios de proteómica en relación al envejecimiento.*

1. Celniker SE, Rubin GM. The *Drosophila melanogaster* genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2003;4:89-117.
2. Chudin E, Walker R, Kosaka A, Wu SX, Rabert D, et al. Assessment of the relationship between signal intensities and transcript concentration for Affymetrix GeneChip arrays. *Genome Biol*, 2002;3(1):RESEARCH0005:1-10.
3. Chung WH, Dao RL, Chen LK, Hung SI. The role of genetic variants in human longevity. *Ageing Res Rev*, 2010;Suppl 1:S67-78.
4. Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, Kellis M, Lindblad-Toh K, Lander ES. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007;104(49):19428-19433.

5. Gerstein MB, Lu ZJ, Van Nostrand EL, Cheng C, Arshinoff BI, Liu T; et al. Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE project. *Science*, 2010;330(6012):1775-1787.
6. Hamilton BA, Frankel WN. Of mice and genome sequence. *Cell*, 2001;107(1):13-6.
7. Heather E. Wheeler and Stuart K. Kim. Genetics and genomics of human ageing. *Phil Trans R Soc B*, 2011;366:43-50.
8. Hood L. Systems biology: integrating technology, biology, and computation. *Mech Ageing Dev*, 2003;124:9-16
9. Junyent F, de Lemos L, Verdaguer E, Folch J, Ferrer I, Ortuño-Sahagún D, Beas-Zárate C, Romero R, Pallàs M, Auladell C, Camins A. Gene expression profile in JNK3 null mice: a novel specific activation of the PI3K/AKT pathway. *J Neurochem*, 2011;117(2):244-252.
10. Kaliman P, Parrizas M, Camins A, Ferrer J, Escorihuela RM, Pallàs M. Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process. *Ageing Research Reviews* (Aceptado), 2011.
11. Klamt S, Saez-Rodríguez J, Gilles ED. Structural and functional analysis of cellular networks with Cell Net Analyzer. *BMC Syst Biol*, 2007;1:2.
12. Ortuño-Sahagún D, Rivera-Cervantes MC, Gudiño-Cabrera G, Junyent F, Verdaguer E, Auladell C, Pallàs M, Camins A, Beas-Zárate C. Microarray analysis of rat hippocampus exposed to excitotoxicity: Reversal Na(+)/Ca(2+) exchanger NCX3 is overexpressed in glial cells. *Hippocampus*, 2010;doi:10.1002/hipo.20869.
13. Ortuño-Sahagún D, Rojas-Mayorquín AE, Guzmán-Brambila C, Canudas AM, Folch J, Cammins A, Pallàs M. Gene expression profile during postnatal brain development of SAMP8 identifies genes involved in aging. En preparación.
14. Rojas-Mayorquín AE, Torres-Ruiz NM, Ortuño-Sahagún D, Gudiño-Cabrera G. Microarray analysis of striatal embryonic stem cells induced to differentiate by ensheathing cell conditioned media. *Dev Dyn*, 2008;237(4):979-94.
15. Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol*, 1999;9(17):939-45.
16. Spannagl M, Mayer K, Durner J, Haberer G, Fröhlich A. Exploring the genomes: from Arabidopsis to crops. *J Plant Physiol*, 2011;168(1):3-8.

### **Argelia E. Rojas Mayorquín**

Médico cirujano y doctora en Ciencias Biomédicas (Neurociencias) por la Universidad de Guadalajara, México. Miembro titular colegiado de la Asociación Médica de Jalisco (AMJ), Colegio Médico, A.C. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde 2009. Socia activa de diversas sociedades médicas y científicas nacionales e internacionales, entre las que figuran la Centenaria Sociedad Médica de Guadalajara, Colegio Médico A.C., la Société des Neurosciences (SDN, Francia), la Society for Developmental Biology (SDB), la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo (SMBD) y la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas (SMCF). Se ha desempeñado como médico clínico y realizado estancias de investigación en el Instituto Cajal (Madrid, España), Universidad de Leipzig (Alemania), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, París, Francia), en la Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona (España) y dos años de estancia posdoctoral en el Hospital de la Salpêtrière (París, Francia). Ha sido evaluadora de proyectos para universidades nacionales y asesora de tesis de licenciatura. Ha publicado seis artículos de investigación en revistas internacionales con arbitraje. Diversos capítulos de libros (uno de ellos por la editorial McGraw-Hill), un manual de prácticas en biología del desarrollo, y resúmenes de investigación de congresos nacionales e internacionales. Entre sus contribuciones se encuentra el reporte de una nueva secuencia en GeneBank (DQ916292 *Rattus norvegicus* tenascin C mRNA, partial cds). Actualmente es investigadora del Instituto de Geriatria y sus líneas de investigación se enfocan en los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de diferenciación de células neurales, el papel de las proteínas solubles en los procesos de neurogénesis en el cerebro de mamíferos adultos, así como los mecanismos moleculares que subyacen en los procesos de neurodegeneración y envejecimiento.

### **Verónica Palomera Ávalos**

Es bióloga egresada de la Universidad de Guadalajara y maestra en Ciencias, con orientación en Ciencias Biológicas, también por la Universidad de Guadalajara. Obtuvo calificación de 100 y mención honorífica tanto en la tesis de licenciatura como en la de la maestría. Cuenta con cinco publicaciones de artículos científicos en revistas internacionales en diferentes áreas de la Biología. Estuvo

a cargo durante un año del Laboratorio de Taxonomía Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias en la U de G, en donde se hizo cargo del secuenciador automatizado de DNA. Actualmente trabaja en el laboratorio de neurofisiología y neuroquímica en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Guadalajara, con la cuantificación de neurotransmisores en ratas adultas. Es miembro de la Society for Neuroscience, en donde ha participado con trabajos para los congresos de la sociedad desde 2008. Además, ha participado en congresos nacionales de Ciencias Fisiológicas con diversos trabajos relacionados con la cuantificación de neurotransmisores en ratas adultas durante crisis epilépticas inducidas mediante 4-aminopiridina. Ha impartido las clases de Genética Avanzada y Genética Evolutiva a nivel licenciatura durante cinco años y fungido como secretaria de la Academia de Biología Molecular y Genética.

### **Ana Laura Márquez Aguirre**

Es químico farmacobióloga egresada de la Universidad de Guadalajara, maestra y doctora en Ciencias Biomédicas con orientación en Inmunología en el Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara. Actualmente es investigadora titular A del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ-CONACYT) en la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica. Es miembro del cuerpo académico y profesora del posgrado interinstitucional en Ciencia y Tecnología (PICYT), incorporado al Padrón Nacional de Posgrado del CONACYT. Ha impartido las materias de Biología Molecular, Microbiología Médica, Bioquímica e Inmunología, tanto en licenciatura como en posgrado. Ha publicado artículos de investigación en revistas científicas nacionales e internacionales, dirige tesis de licenciatura y posgrado y es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (2011-2013). Actualmente realiza investigación básica para la evaluación de moléculas bioactivas derivadas de plantas en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, así como investigación aplicada para la validación de técnicas moleculares en el diagnóstico de enfermedades infectocontagiosas.

### **Daniel Ortuño Sahagún**

Es investigador titular de la Universidad de Guadalajara y miembro del Sistema Nacional de Investigadores,

nivel I. Biólogo por la Universidad de Guadalajara, con maestría en Ciencias en Biología Celular (U de G-IMSS) y doctorado en Ciencias en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid. Ha realizado dos posdoctorados en el Instituto Cajal de Neurociencias, en Madrid, España, investigando el desarrollo del sistema nervioso de invertebrados y vertebrados. Es miembro fundador y actualmente coordinador en el CUCBA del doctorado en Ciencias Biomédicas de la U de G. Es profesor invitado de la Universidad de Barcelona, de la Universidad Pablo de Olavide en Sevilla y de la Universidad Complutense de Madrid. Ha impartido las materias de Biología Celular, Biología Molecular y Biología del Desarrollo, tanto en licenciatura como en doctorado. Ha impartido conferencias en España: Madrid, Barcelona, Sevilla y Alicante, y en Leipzig, Alemania. Ha sido presidente del Colegio de Biólogos de Jalisco, director del Instituto de Fisiología Celular y jefe del Departamento de Biología Celular y Molecular del CUCBA. Ha publicado los libros: *El desarrollo de la Biología en Jalisco*, *Tópicos de actualización en neurobiología*, *Biología molecular del desarrollo, neurodegeneración y medicina genómica* y *Biología molecular: Fundamentos y aplicaciones*, recientemente publicado por McGraw-Hill. Actualmente, en la Universidad de Guadalajara, investiga los mecanismos moleculares de la diferenciación de células madre en el sistema nervioso central, así como los mecanismos moleculares involucrados en la neurodegeneración, además de trabajar en el desarrollo de vacunas mediante ingeniería genética.

**Ingrid Fetter Pruneda\***

Laboratorio de Biología Integrativa, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

**Leonora Olivos Cisneros\***

Laboratorio de Biología Integrativa, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

**Gabriel Gutiérrez Ospina**

Laboratorio de Biología Integrativa, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

**Shaday Michán**

Laboratorio de Biología Integrativa, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Instituto de Geriatria. Departamento de Investigación Básica, Secretaría de Salud.

shaday.michan@salud.gob.mx

\*Ambas autoras contribuyeron equitativamente a este trabajo.

n este texto discutimos algunos datos, ideas y reflexiones sobre el proceso de envejecimiento desde el punto de vista epigenético. El aumento o la disminución en la esperanza de vida, la longevidad y la propensión a desarrollar patologías relacionadas con la edad se han asociado, por un lado, a mecanismos genéticos, esto es, a alteraciones irreversibles en la composición y la secuencia del genoma, como las mutaciones o la sobreexpresión de genes y, por otro, a mecanismos epigenéticos que explican el envejecimiento en relación a los cambios reversibles e independientes de la secuencia génica. Las modificaciones postraduccionales como la metilación, acetilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación que regulan a las proteínas básicas asociadas al ADN, así como los niveles de metilación de este ácido nucleico, determinan la conformación de la cromatina y la actividad transcripcional. Estas marcas, conocidas en conjunto como el epigenoma, se modifican de manera reversible y generan diversos patrones de expresión génica y de proteínas, integrando las señales intrínsecas y extrínsecas provenientes del medio ambiente con una serie de cambios fisiológicos en los organismos. La dinámica epigenética influye en la heterogeneidad de las respuestas celulares y conduce a múltiples fenotipos a partir de un único genoma, además regula, entre otros eventos, la forma diferencial en la que se manifiestan el deterioro, la capacidad de la respuesta al estrés, la pérdida en la plasticidad fenotípica y la heterocronía con la que envejecen los diferentes órganos e individuos con el paso del tiempo.

### **El envejecimiento, la plasticidad fenotípica y los epigenomas**

El envejecimiento es un proceso complejo, inevitable, gradual y dependiente del tiempo, en el que cambios a nivel molecular, celular y tisular conducen a un declive gradual en las capacidades fisiológicas de los organismos (Funayama, 2007; Hwang, 2009; Tollefsbol, 2009). Se le ha asociado con una pérdida de las funciones reproductivas y con un aumento en la vulnerabilidad para desarrollar ciertas patologías. Es modulado tanto por factores ambientales como genéticos y se manifiesta de forma heterogénea aun entre órganos o individuos con un genoma idéntico. Con base en esto, el envejecimiento se puede considerar como una manifestación de la plasticidad fenotípica, la cual es la habilidad biológica de producir

morfologías, estados fisiológicos y conductas alternativas a partir de un solo genoma en función de las condiciones ambientales y dependiendo de las condiciones intrínsecas de un sistema, por ejemplo, el contexto temporal y molecular (Feinberg, 2007; West-Eberhard, 1989). Dado que dichas alternativas están influenciadas por mecanismos no codificados en la secuencia del ADN, los procesos epigenéticos han logrado explicar exitosamente la plasticidad fenotípica, y la integración de ambos está permitiendo entender aspectos importantes de la biología que subyace al intrincado fenómeno del envejecimiento.

Los orígenes conceptuales de la epigenesis datan desde Aristóteles (384-322 a.C.), quien planteaba que el desarrollo de los organismos se daba a partir de “algo” sin forma. Sin embargo, fue hasta 1942 cuando el biólogo del desarrollo Conrad Waddington utilizó el término de epigenética –cuyo significado etimológico es “por encima de la genética”– para explicar cómo genotipos idénticos podían generar una amplia variedad de fenotipos durante el desarrollo. Actualmente, la epigenética se define como los cambios en la expresión génica independientes de modificaciones en la secuencia del ADN, y que son potencialmente heredables (Holliday, 1975; Jaenisch, 2003). A diferencia de la genética donde la entidad de estudio que marca las características de los seres vivos –los genes– se mantiene constante durante el ciclo de vida, los cambios epigenéticos son dinámicos y reversibles, y por medio de modificaciones en la expresión génica logran integrar señales extrínsecas provenientes del medio ambiente a la fisiología de los organismos.

La epigenética ha revolucionado múltiples concepciones en las ciencias biológicas; por ejemplo, desde los años cuarenta fue propuesta como el mecanismo responsable de regular los eventos del desarrollo que se producen desde la fertilización de un cigoto hasta la generación de un organismo maduro. En la actualidad sabemos que la epigenética subyace en la generación de linajes celulares a partir de un mismo genoma, así como en las diferencias fenotípicas entre organismos de la misma especie. Incluso, la epigenética ha permitido replantear conceptos evolutivos relacionados con la especiación, debido a que a partir de ésta es posible explicar diversos fenotipos alternativos originados de secuencias genéticas conservadas y heredables.



Los procesos epigenéticos regulan la expresión de genes a través de alteraciones en la estructura de la cromatina. El ADN de los organismos eucariontes se encuentra asociado a proteínas básicas denominadas histonas, las cuales compactan el material nucleico dentro del núcleo y regulan la accesibilidad de diversos factores a sus secuencias diana para ser transcritas. A la asociación entre ADN y proteínas se le conoce como cromatina, la unidad básica que la constituye es el nucleosoma, el cual está formado por un segmento de ADN de 147 pares de bases enrollado alrededor de un octámero de histonas (2H2A y B, 2H3 y 2H4) (Allis, 2007). La cromatina experimenta una dinámica de compactación y relajamiento a lo largo del ciclo celular; por ejemplo, en células en interfase se distinguen dos tipos de cromatina: la eucromatina, que es transcripcionalmente activa porque su bajo nivel de compactación permite el acceso a la maquinaria de transcripción; y la heterocromatina, que se encuentra altamente condensada e inaccesible (figura 1). De tal manera que el momento, el lugar y la forma en que un gen se expresa está en gran parte determinado por el estado de compactación del ADN en el núcleo.

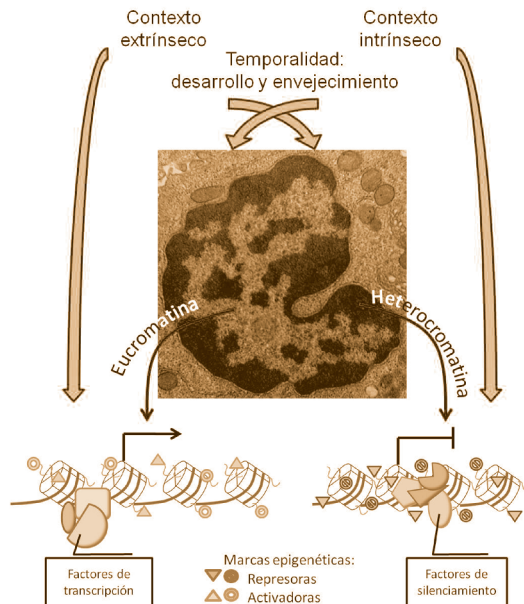


Figura 1. Tipos de cromatina. La conformación relajada de la eucromatina genera regiones electrolúcidas, mientras que la heterocromatina muestra zonas electrodensas en la micrografía electrónica. Modificaciones epigenéticas asociadas a la cromatina permiten el acceso de los factores de transcripción o de silenciamiento génico, respectivamente. El grado de compactación del ADN depende tanto del contexto extrínseco como del intrínseco.

Las modificaciones epigenéticas en la estructura de la cromatina son procesos altamente dinámicos y reversibles que enriquecen la diversidad transcripcional determinada por un solo genoma e incluyen alteraciones postraduccionales en las histonas como la acetilación, la metilación, la fosforilación, la ubiquitinación, la sumoilación y la biotilación; la metilación de las moléculas de ADN y ARN no codificante; y otros procesos que también regulan la expresión de los genes como la ribosilación de ADP, las variantes de histonas, la remodelación de la cromatina dependiente de ATP, la posición cromosomal y la compactación por otras proteínas como MeCP2 y HP1 (Allis, 2007; Levenson, 2005).

Así como todas estas modificaciones regulan la estructura de la cromatina y, en consecuencia, el despliegue de los diversos fenotipos que manifiesta un organismo desde el desarrollo hasta la madurez, también el envejecimiento es influenciado a nivel epigenético (figura 2). El grupo de Vaniushin y colaboradores en 1967 describió por primera vez la relación entre el envejecimiento y la epigenética, al demostrar una disminución global en la metilación del ADN del salmón jorobado con la edad (Berdyshev, 1967). Posteriormente, esto también se describió en otros organismos junto con diversas modificaciones relacionadas con el envejecimiento como las que se mencionan a continuación: 1) una hipometilación global del ADN, pero una hipermetilación regional en genes específicos; 2) un desbalance en la actividad de las enzimas que catalizan las reacciones de acetilación y desacetilación de histonas como las HATs, HDACs I, III y IV y las sirtuinas; 3) cambios en la actividad de la enzima telomerasa y la subsecuente longitud telomérica; 4) formación de condensaciones de heterocromatina asociadas al envejecimiento (conocidas como SAHF por sus siglas en inglés); 5) alteraciones en la estructura de la cromatina mediadas por la vía de señalización de Wnt; 6) represión de genes que controlan el ciclo celular dependiente de la familia de proteínas silenciadoras Polycomb; 7) redistribución de factores epigenéticos por rearrreglos del ADN en respuesta al estrés exógeno y otros factores; y 8) cambios en la expresión de microARNs que controlan la reparación del ADN, la defensa oxidativa y otros procesos celulares que repercuten en la esperanza de vida (Tollefsbol, 2009). A continuación describimos con más detalle algunos de estos procesos epigenéticos y su relación con el envejecimiento.

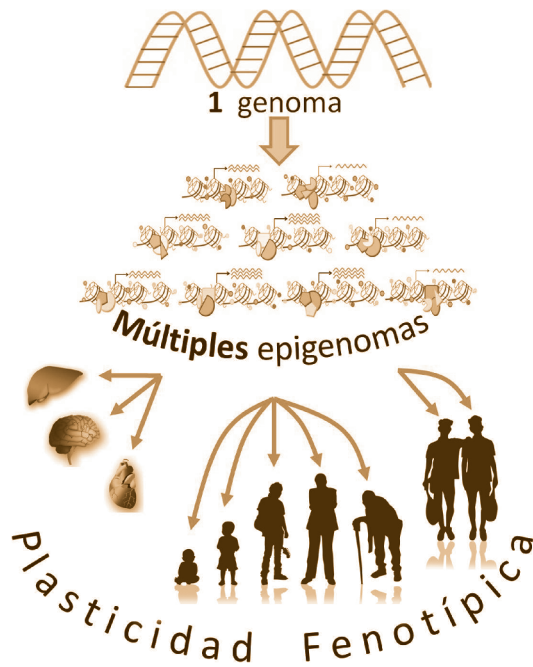


Figura 2. Plasticidad fenotípica. Los mecanismos epigenéticos promueven la manifestación de diversas morfologías, estados fisiológicos y conductas alternativas a partir de un mismo genoma. Algunos ejemplos de esto son la especificación de los linajes celulares que forman los diferentes tejidos de un organismo, las diferencias fenotípicas entre los gemelos monocigotos y el despliegue de fenotipos que acompañan el desarrollo o envejecimiento de los seres vivos.

## Las modificaciones epigenéticas en el envejecimiento

### Metilación de ADN

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo en el residuo de carbono 5 del anillo de pirimidina de las citosinas (5meC) contenidas en este ácido nucleico. Se lleva a cabo por una familia de enzimas denominadas metiltransferasas de ADN (DNMTs por sus siglas en inglés), que transfieren grupos metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM) exclusivamente a los residuos de citosina que se encuentran como dinucleótidos citosina-fosfato-guanina (CpG). La metilación del ADN conduce a cambios significativos en la estructura de la cromatina que interfieren con la habilidad de los factores transcripcionales de unirse a sus elementos regulatorios, dando lugar al silenciamiento de genes. Además, varias proteínas como MECP2, MBD1, MBD2, MBD4 y Kaiso

reconocen e interaccionan con los residuos CpG metilados, lo cual induce una mayor compactación de la cromatina y la represión transcripcional. Estas proteínas, a su vez, reclutan enzimas remodeladoras de la cromatina como las desacetilasas de histonas, las cuales también promueven la condensación de la misma. La metilación del ADN es más estable que las modificaciones de las histonas y juega un papel central en muchos procesos biológicos como la impronta celular, la diferenciación, la inactivación del cromosoma X, la carcinogénesis y el envejecimiento (Allis, 2007; Levenson, 2005).

La metilación global del ADN, que disminuye con la edad, también se ha asociado con el riesgo de desarrollar patologías como el cáncer, la arterioesclerosis, la neurodegeneración, la autoinmunidad y los trastornos psiquiátricos. El contenido de 5meC en el ADN disminuye en líneas celulares senescentes *in vitro* e *in vivo* en los tejidos de los roedores viejos. La hipometilación puede ser modulada por diferentes mecanismos como la actividad y la expresión de metiltransferasas de ADN, la vía metabólica de moléculas de un carbono y la integridad del genoma. Se ha demostrado que la actividad de la metiltransferasa de mantenimiento, DNMT1, disminuye sustancialmente con la edad, por lo que el patrón de metilación normal se altera. La molécula donadora de grupos metilo, SAM, la cual deriva de la metionina, se metila en la vía metabólica de moléculas de un carbono, misma que se muestra afectada con el envejecimiento y en algunas patologías. Además, los defectos en esta vía se han asociado a la acumulación de dos inhibidores de las reacciones de metilación, la homocisteína y la S-adenosil-homocisteína. Diversos estudios han demostrado que la acumulación de lesiones en el ADN afecta la capacidad de metilación de las metiltransferasas que actúan sobre este ácido nucleico, por lo que la disminución en la eficiencia de los sistemas de reparación con el envejecimiento promueve un decremento en los niveles de dicha modificación. Por sus implicaciones, las metiltransferasas, la vía metabólica de moléculas de un carbono y las enzimas de reparación de ADN son considerados blancos terapéuticos potenciales para revertir los efectos del envejecimiento (Sedivy, 2008; Tollefsbol, 2009).

Por otro lado, en las regiones promotoras de genes específicos, sobre todo de los que codifican para proteínas de mantenimiento, existen islas CpG en el

extremo 5', susceptibles a ser metiladas y, por lo tanto, reprimidas. Dado que el estado de metilación de los genes específicos cambia con el paso del tiempo, se cree que la hipermetilación de genes relacionados con algún tipo de cáncer podría promover la formación de tumores dependientes de la edad (Tollefsbol, 2009; Tra, 2002).

### **Modificaciones en histonas**

La metilación, además de modificar directamente al ADN, también tiene como blanco a los residuos de lisina y arginina de las histonas. La metilación de lisinas es mediada por las metiltransferasas de histonas (HMTs por sus siglas en inglés) y la metilación de las argininas es catalizada por las argininas metiltransferasas de proteínas (PRMTs por sus siglas en inglés). La metilación de las histonas participa tanto en la represión como en la activación transcripcional, esto dependiendo del residuo que modifican y del número de grupos metilo añadidos. En el caso de las lisinas, éstas pueden estar mono, di o trimetiladas, mientras que las argininas se encuentran sólo en estados mono o dimetilados (Allis, 2007; Hsieh, 2005). Cambios en la metilación de las histonas también se han relacionado con el proceso de envejecimiento. Por ejemplo, la trimetilación en la lisina 20 de la H4 (H4K20me3), una marca característica de heterocromatina, incrementa en el hígado de ratas con la edad (Sarg, 2002) y se encuentra enriquecida en un modelo celular de progeria (Shumaker, 2006). Adicionalmente en el envejecimiento de ovocitos se alteran los patrones de metilación de diversos residuos en las histonas (Manosalva, 2010).

La acetilación de las histonas es la modificación epigenética que se ha estudiado más ampliamente. Ésta se caracteriza por la adición covalente de un grupo acetilo a un residuo de lisina, localizado principalmente en el extremo amino-terminal, lo cual neutraliza la carga positiva de la histona y genera una interacción más laxa o relajada con el ADN. La reacción de acetilación la llevan a cabo enzimas acetiltransferasas de histonas (HATs por sus siglas en inglés); sin embargo, este mecanismo es altamente dinámico y puede ser revertido por las desacetilasas de histonas (HDACs, por sus siglas en inglés). La acetilación repercute en la expresión génica, pues en un estado desacetilado las histonas empaquetan al ADN en cromatina condensada, lo cual previene el acceso de activadores transcripcionales a sus genes blanco, resultando en represión transcripcional (Allis,

2007; Hsieh, 2005). Los niveles de acetilación se alteran con la edad debido a un desbalance en la actividad de las HATs y HDACs (Tollefsbol, 2009). Por ejemplo, en un modelo murino se demostró que el deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento, particularmente la pérdida de la memoria declarativa, está relacionado con la falta de un aumento transitorio de los niveles de acetilación de la lisina 12 de la histona 4 (H4K12), lo cual conduce a cambios en la expresión de genes en el hipocampo asociados al aprendizaje en los animales jóvenes, pero no en los viejos (Peleg, 2010). Por otro lado, la actividad de las HATs, como la proteína de unión a CREB (CBP, por sus siglas en inglés) en el hipocampo, se asocia a modificaciones en la expresión génica que son indispensables durante la formación de la memoria a largo plazo (Hsieh, 2005). Por lo tanto, el desbalance en los niveles de acetilación está relacionado con el deterioro cognitivo, uno de los principales daños funcionales que se asocian al envejecimiento. Debido a la relevancia clínica de esta condición, existen trabajos de investigación en modelos de aprendizaje y memoria en los que la manipulación farmacológica del epigenoma como, por ejemplo, el uso de inhibidores de desacetilasas revierte el detrimento en las funciones cerebrales en organismos envejecidos (Peleg, 2010). Además, las sirtuinas –un grupo de desacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup> que se encuentran conservados desde levaduras hasta mamíferos– son uno de los mecanismos moleculares clave en la regulación epigenética de la longevidad y del proceso de envejecimiento (Michan, 2007). Por ejemplo, la sobreexpresión de estas proteínas en el cerebro de ratón revierte la pérdida del silenciamiento génico asociada al envejecimiento y promueve la estabilidad genómica (Oberdoerffer, 2008).

Existen otras modificaciones postraduccionales de las histonas como la fosforilación, la cual se descubrió en el proceso de condensación de cromosomas durante la mitosis y la meiosis. La fosforilación de la H3 ha sido la más estudiada y en ella se ha visto que la serina 10 (H3ser10) es modificada durante la activación celular en respuesta a señales mitogénicas y, recientemente, también se ha asociado con la activación transcripcional en eucariontes. Esta modificación es catalizada por diversas cinasas como la proteína ribosomal S6 cinasa 2 (RSK2) y la proteína cinasa 1-2 activada por mitógenos y estrés (MSK1-2), mientras que las fosfatasa como PP1 y PP2A remueven

los grupos fosfato de las histonas. Adicionalmente, la fosforilación en H3Ser10 se ha relacionado con una subsecuente acetilación en la Lys 14 de la misma histona (Allis, 2007; Hsieh, 2005).

En la ubiquitinación y la sumoilación de histonas, enzimas específicas adicionan covalentemente los polipéptidos de ubiquitina o SUMO, respectivamente. La ubiquitinación puede ser represora o activadora dependiendo de los residuos específicos afectados. Sin embargo, la sumoilación parece tener una función principalmente silenciadora (Shiio, 2003). La monoubiquitinación de H2B es activadora de la transcripción y es mediada por Rad6/Bre1, mientras que la monoubiquitinación de H2A promueve la represión transcripcional y es catalizada por las proteínas del grupo polycomb Bmi1/Ring1A. La ubiquitinación también puede ser removida por la acción de proteasas como Ubp8 y Ubp10 (Allis, 2007; Hsieh, 2005).

A pesar de la función epigenética que la fosforilación, ubiquitinación y sumoilación desempeñan en las células, aún se desconoce si cambios en estas modificaciones están asociados con el envejecimiento.

### **Una perspectiva epigenética del envejecimiento**

Diversos estudios han demostrado que los cambios epigenéticos que ocurren durante el envejecimiento son estocásticos o se dan en respuesta a factores extrínsecos (Sedivy, 2008). Éstos conducen a un fenómeno conocido como deriva epigenética a partir del cual se establecen epigenomas diferentes en genomas idénticos. El fenómeno afecta de manera diferencial la homeostasis fisiológica y la aparición de síntomas asociados al envejecimiento en organismos que comparten secuencias similares de ADN (Fraga, 2007; Tollefsbol, 2009).

Los gemelos monocigóticos constituyen un modelo óptimo para el estudio del origen de diferencias fenotípicas en organismos genotípicamente idénticos (figura 2) y diversos estudios en éstos han contribuido a entender el papel de la deriva epigenética en el envejecimiento. Los gemelos monocigóticos comparten el mismo material genético, sin embargo, la aparición de enfermedades puede ser muy diferente en ambos. Fraga y colaboradores realizaron un estudio en el que analizaron los patrones globales y locus-específico de metilación de ADN, así

como las diferencias en las modificaciones de histonas en muestras de sangre de gemelos monocigotos. Los resultados demostraron que las marcas epigenéticas son esencialmente idénticas en gemelos jóvenes, mientras que en los pares de gemelos viejos existen variaciones sustanciales en varios tejidos distribuidas a lo largo de todo el genoma y que afectan tanto a las secuencias repetidas del ADN como a los genes de una sola copia. Se encontró que el grado de discordancia en los patrones epigenéticos está relacionado con los factores ambientales, ya que éste se acentúa entre los gemelos con estilos de vida contrastantes o que han vivido separados la mayor parte de su vida. Adicionalmente, Fraga y colaboradores (2005) describieron que las diferencias en la expresión génica entre los pares de gemelos viejos son cuatro veces mayores que las observadas entre gemelos jóvenes. Diversos factores ambientales como fumar, la actividad física y la dieta, entre otros, han sido propuestos como cruciales en el establecimiento de diferencias epigenéticas. Sin embargo, es posible que defectos en la transmisión y en el mantenimiento de la información epigenética también se acumulen durante el envejecimiento y participen en el proceso de deriva epigenética (Fraga, 2005; Fraga, 2007).

Otros ejemplos interesantes que asocian a los factores ambientales como moduladores del envejecimiento son las diferencias fenotípicas encontradas en animales clonados a partir del ADN de un donante. También se ha observado la plasticidad fenotípica relacionada con la esperanza de vida en insectos sociales como las hormigas; en éstas, la estirpe de las reinas es más longeva en comparación con las obreras, a pesar de que los genomas de ambas castas son prácticamente idénticos. En el caso de estos insectos, se cree que el régimen nutricional particular de la hormiga reina es el que contribuye a incrementar la esperanza de vida por más de 10 veces (Bonasio, 2010). En contraparte, en animales de laboratorio mantenidos en condiciones ambientales controladas, el envejecimiento se manifiesta de forma heterogénea y las diferencias en la longevidad se pueden explicar por procesos epigenéticos estocásticos (Finch, 2000; Tollefsbol, 2009).

Desde la perspectiva clínica y por tratarse de procesos dinámicos y modulables, una aproximación epigenética del envejecimiento abre la posibilidad de modular la progresión o el impacto que tiene el paso del tiempo en el detrimento

de la fisiología en el ser humano. Por ejemplo, el deterioro de los procesos neurales, asociado a la edad, ha sido objeto de diversas investigaciones. En un intento por entender los mecanismos moleculares del envejecimiento cerebral en humanos, el grupo encabezado por Tao Lu analizó los perfiles transcripcionales de la corteza cerebral frontal en sujetos de 26 a 106 años de edad. Los resultados demostraron que a partir de los 40 años existe una disminución en la expresión de los genes que participan en plasticidad sináptica, transporte vesicular y función mitocondrial. Además, también disminuyen los genes asociados a la respuesta a estrés, los genes antioxidantes y los de reparación de ADN (Lu, 2004).

Por otra parte, los síndromes progeroides, caracterizados por ser desórdenes monogenéticos en donde los genes afectados codifican para proteínas de reparación de ADN (como las helicasas en el síndrome de Werner) o de estructura del nucleoesqueleto (como lámina A/C en la progeria Hutchinson-Gilford), recapitulan varios de los síntomas del envejecimiento en edades prematuras. Sin embargo, a pesar de su origen genético, en estos síndromes también se observa una inestabilidad genómica, incluyendo erosión de telómeros, desorganización global de la cromatina y una pérdida notoria de heterocromatina. Por lo tanto, las anomalías nucleares que tienen en común los síndromes progeroides apoyan la idea de que el envejecimiento natural también está mediado por mecanismos epigenéticos (Navarro, 2006).

La predisposición a padecer algunas patologías se le ha atribuido a procesos epigenéticos que se manifiestan en algunos órganos de manera específica. Por ejemplo, la propensión a desarrollar la enfermedad de Alzheimer con la edad se ha explicado por incrementos en la expresión de los genes que codifican para la proteína precursora de amiloide (APP), BACE y PS1, a consecuencia de la hipometilación global del ADN asociada a la edad, lo cual repercute en un aumento en la producción de  $\beta$ -amiloide. También, la diferenciación continua y la memoria de exposición antigénica característica del sistema inmune adaptativo depende, entre otros factores, de la impronta epigenética mediada por la metilación del ADN. La hipometilación asociada al envejecimiento repercute en el funcionamiento de los linfocitos de memoria y puede generar desórdenes autoinmunes. Otro ejemplo es la osteoartritis, patología derivada de una disminución en

el contenido de colágena y asociada a la desmetilación de promotores e inducción de la expresión de genes que codifican para las proteasas de matriz extracelular en los condrocitos, las cuales en condiciones normales se mantienen silenciados (Tollefsbol, 2009).

En resumen, la regulación epigenética espacial y tejido-específica de los metazoarios sugiere que el diseño y la implementación de estrategias farmacológicas y terapéuticas encaminadas a combatir el deterioro y las enfermedades relacionadas con el envejecimiento deben contemplar la heterocronía fisiológica que se experimenta con el paso de la edad.

Desde la perspectiva epigenética, la definición del envejecimiento está directamente relacionada con los cambios reversibles de la cromatina que regulan la expresión génica diferencial, la plasticidad fenotípica y la fisiología de los organismos con el paso del tiempo. Si bien diversos cambios en las diferentes modificaciones epigenéticas se han asociado con el envejecimiento, aún falta mucho por explorar en este campo. Por ejemplo, desconocemos cómo las diferentes marcas epigenéticas “dialogan” entre sí y cómo las células integran dicha información y producen las diversas manifestaciones de la plasticidad fenotípica asociadas al envejecimiento. Tampoco sabemos si existe un patrón de los epigenomas relacionado con la fragilidad o la robustez con la que los organismos enfrentan dicho proceso. Estos estudios sobre el estado global de la cromatina, así como la función, interrelación y efectos de las diferentes modificaciones epigenéticas, pudieran contribuir en un futuro a entender con más detalle la biología del envejecimiento y al descubrimiento de nuevos biomarcadores de este proceso.

El dinamismo de la estructura cromatínica abre la posibilidad de modular los cambios deletéreos que experimentan los individuos con el paso del tiempo. Ante el panorama actual en el que la medicina tiene el reto de personalizar los tratamientos en función del genoma de cada individuo, es muy importante considerar el desarrollo de estrategias clínicas que integren la heterogeneidad del envejecimiento con el epigenoma y heterocronía de cada órgano.

1. Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. Epigenetics. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007:502 p.
2. Berdyshev GD, Korotaev GK, Boiarskikh GV, Vaniushin BF. [Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback and its changes during spawning]. *Biokhimiia*, 1967;32:988-93.
3. Bonasio R, Zhang G, Ye C, Mutti NS, Fan, X, Qin N, Donahue G, Yang P, Li Q, Li C, Zhang P, Huang Z, Berger SL, Reinberg D, Wang J, Liebig J. Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Science*, 2010;329:1068-71.
4. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, 2007;447:433-40.
5. Finch CE, Kirkwood TBL. Chance, development, and aging. New York: Oxford University Press, 2000:x, 278 p.
6. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling, C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005;102:10604-9.
7. Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet*, 2007;23:413-8.
8. Funayama R, Ishikawa F. Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma*, 2007;116:431-40.
9. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 1975;187:226-32.
10. Hsieh J, Gage FH. Chromatin remodeling in neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol*, 2005;17:664-71.
11. Hwang ES, Yoon G, Kang HT. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009;66:2503-2524.
12. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 2003;33 Suppl:245-54.
13. Levenson JM, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci*, 2005;6:108-18.
14. Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 2004;429:883-91.
15. Manosalva I, Gonzalez A. Aging changes the chromatin configuration and histone methylation of mouse oocytes at germinal vesicle stage. *Theriogenology*, 2010;74:1539-47.
16. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 2007;404:1-13.
17. Navarro CL. Molecular bases of progeroid syndromes. *Human Molecular Genetics*, 2006;15:R151-R161.
18. Oberdoerffer P, Michan S, Mcvay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, Hartlerode A, Stegmuller J, Hafner A, Loerch P, Wright SM, Mills KD, Bonni A, Yankner BA, Scully R, Prolla TA, Alt FW, Sinclair DA. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell*, 2008;135:907-18.
19. Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer, A. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science*, 2010;328:753-6.
20. Sarg B, Koutzamani E, Helliger W, Rundquist I, Lindner HH. Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. *J Biol Chem*, 2002;277:39195-201.
21. Sedivy JM, Banumathy G, Adams PD. Aging by epigenetics--a consequence of chromatin damage? *Exp Cell Res*, 2008;314:1909-17.
22. Shiio Y, Eisenman, RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003;100:13225-30.
23. Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, Adam SA, Bozovsky MR, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Khuon S, Collins FS, Jenuwein T, Goldman RD. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006;103:8703-8.
24. Tollefsbol TO. Epigenetics of aging. London: Springer, 2009:469 p.
25. Tra J, Kondo T, Lu Q, Kuick R, Hanash S, Richardson

B. Infrequent occurrence of age-dependent changes in CpG island methylation as detected by restriction landmark genome scanning. *Mech Ageing Dev*, 2002;123:1487-503.

26. West-Eberhard MJ. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1989;20:30.

### **Ingrid Fetter Pruneda**

Bióloga por la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para su tesis de licenciatura estudió la participación del gen *trithorax tonalli* durante la metamorfosis de *Drosophila melanogaster*. Candidata a doctora en Ciencias por la UNAM, realiza su tesis doctoral sobre el papel y caracterización de la estructura de la cromatina en un modelo de plasticidad cortical al nacimiento en ratas. Ganadora de la beca Fulbright para realizar una estancia de investigación para estudiar el papel de la epigenética en la conducta en hormigas en la Universidad de Rockefeller, Nueva York. Ha sido seleccionada por la FENS-IBRO como una de los 30 estudiantes para asistir al curso internacional "Development and Plasticity of Cortical Representation". Ha impartido la clase "Bases genéticas de la conducta" en la Facultad de Psicología. Ha asesorado una tesis de licenciatura sobre las bases genómicas de la plasticidad intermodal en ratas. Es coautora de un artículo de revisión sobre plasticidad cerebral y epigénesis, y ha participado en cinco congresos nacionales e internacionales.

### **Leonora Olivos Cisneros**

Licenciada en Investigación Biomédica Básica por la Universidad Nacional Autónoma de México. Su tesis de licenciatura se enfocó al estudio de los efectos de la exposición al vanadio sobre la proliferación celular del complejo neuroventricular. Candidata a doctora en Ciencias Biomédicas por la UNAM, realiza su tesis doctoral sobre el papel de los mecanismos de regulación del ciclo celular y el acortamiento telomérico en el proceso de diferenciación de las células troncales neurales. Desde 2001 ha realizado diversas estancias de investigación en laboratorios de facultades e institutos de la UNAM. Su excelencia académica sido reconocida por la Fundación Ing. Bernardo Quintana Arriola y con la medalla Gabino Barreda. Ha impartido clases y conferencias en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en la Facultad de Medicina y para la Dirección General de Orientación y Servicios Educativos, UNAM. Ha participado en tres congresos nacionales e internacionales y es coautora de dos publicaciones en revistas internacionales indexadas.

### **Gabriel Gutiérrez Ospina**

Médico cirujano, maestro en Ciencias Fisiológicas

y doctor en Ciencias por la UNAM. Posdoctorados en el Centro Médico de la Universidad de Duke y en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill. Actualmente es investigador titular de tiempo completo en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y es miembro del Sistema Nacional de Investigadores, nivel II. Líneas de investigación: mecanismos moleculares y celulares que subyacen a los procesos de plasticidad cerebral, neurogénesis y envejecimiento neurales de mamíferos, plasticidad fenotípica en especies de reptiles y anfibios silvestres, magnetorecepción en la tortuga marina, integración multisensorial en el gato y control de la deposición espermática en roedores. Cuenta con más de 40 artículos en revistas internacionales indexadas y más de 600 citas. Ha dirigido 17 tesis de licenciatura, cinco de maestría y cinco de doctorado. Ha sido distinguido con becas y premios otorgados por las fundaciones Pew, Ricardo J. Zevada, Miguel Alemán y Fulbright-García Robles, así como por organizaciones como la Human Frontiers, Funsalud (Premio José Santos en Oftalmología), Grupo Roche-Syntex de México (Premio Jorge Ronsenkranz). Es miembro regular de la New York Academy of Sciences, la American Geophysical Union, la Society for Neuroscience y la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.

### **Shaday Michán**

Bióloga por la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Doctorado en Ciencias Biomédicas en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Posdoctorado de un año en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Cinco años de posdoctorado en la Escuela de Medicina de Harvard en el laboratorio del profesor David A. Sinclair. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Obtuvo en dos ocasiones la medalla Gabino Barreda de la UNAM. Reconocida como "La mejor estudiante de México 1996". Fue profesora en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, de 1995-2001. Becaria del "Molecular Biology of Aging Course", Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts. Ha participado en numerosos seminarios y congresos nacionales e internacionales. Estancias de investigación en Texas A&M University; Laboratory of Experimental Gerontology, NIA, NIH; y Ottawa Health Research Institute, Canadá. Publicaciones principales en *Cell*, *Journal of Neuroscience*, *PLoS One*, *Free Rad Biol Med* y *Aging*. Más de 500 citas. Actualmente es investigadora en Ciencias Médicas del Instituto de Geriátrica. Líneas de investigación: Biogerontología, genética molecular del envejecimiento; estudio de los mecanismos moleculares de envejecimiento que incluyen la dinámica y función del acetiloma celular y el papel de las sirtuinas, gerontogenes que codifican para desacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup>, en el mantenimiento de la homeostasis del acetiloma, en la regulación del envejecimiento y en el desarrollo de enfermedades relacionadas con este proceso.





**Mina Konigsberg**

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento  
Celular. Departamento de Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.  
mkf@xanum.uam.mx

a mitocondria es un organelo que juega un papel fundamental durante el envejecimiento. Si bien su participación como generador principal de especies reactivas de oxígeno (ROS) es reconocido, existen otros aspectos de su funcionamiento que inducen la aparición de diversas enfermedades neurodegenerativas y del envejecimiento. En este capítulo se discutirán aspectos como la dinámica mitocondrial, es decir, la fusión y fisión de las mitocondrias, el daño al ADN mitocondrial, la regulación de la homeostasis del calcio, la inducción de la apoptosis y la degradación de las mitocondrias defectuosas en un proceso conocido como mitofagia.

Durante el envejecimiento, un desbalance en la dinámica mitocondrial fomentará un incremento en la fusión que traerá como resultado mitocondrias gigantes o agregadas que no podrán ser degradadas por mitofagia, pero que estarán dañadas y no colaborarán en la obtención de energía, incrementando así el estrés oxidativo y las ROS, mientras que un aumento en el proceso de fisión formará mitocondrias muy pequeñas fomentando el daño al ADNmit y aumentando las ROS. Ambos procesos convergerán en una disminución del potencial de membrana mitocondrial que culminará con la pérdida de la homeostasis del calcio y la liberación de moléculas apoptogénicas promoviendo la apoptosis y la pérdida masiva de células.

Todos estos eventos, aunados a la disminución en la capacidad de proveer de energía a las células, se conjuntan para hacer de la mitocondria uno de los organelos más importantes e interesantes en el proceso de envejecimiento; por tanto, la comprensión de estos fenómenos ayudará sin duda a entenderlo mejor.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, el proceso de envejecimiento es el resultado progresivo y gradual del deterioro estructural y funcional de macromoléculas y organelos dentro de las células (Kirkwood, 1992).

El organelo que más se ha asociado con este proceso es la mitocondria. Existen varias razones para ello, pero la primordial se relaciona con el hecho de que la mitocondria es una de las fuentes principales de generación de radicales

libres en la célula. Actualmente, una de las teorías más aceptadas para tratar de explicar el envejecimiento es la teoría del envejecimiento por radicales libres, propuesta por Harman en 1956 (Harman, 1956). Esta teoría sugiere que la acumulación de daño a las biomoléculas generado por radicales libres y estrés oxidativo, a lo largo de la vida, es lo que conlleva al envejecimiento (Halliwell y Gutteridge, 1984; Wei, 1988; Finkel y Holbrook, 2000; Simons et al., 2009). Este capítulo tratará sobre el papel de los radicales libres, el estrés oxidativo y los antioxidantes durante el proceso de envejecimiento, por lo que sólo se mencionarán algunos conceptos necesarios para entender la participación de las mitocondrias.

Los radicales libres son moléculas que tienen un electrón desapareado, lo que las hace muy reactivas. Ello las obliga a reaccionar con cualquier molécula vecina para tratar de obtener un electrón y neutralizarse; sin embargo, al quitarle un electrón a otra molécula la convierte en radical libre, iniciando así un proceso en cadena. Esto se debe a que, para ser estables, las moléculas biológicas siempre deben tener a sus electrones en pares y no pueden llevar a cabo reacciones químicas donde se transfiera un electrón solo y no en par. Este tipo de reacciones se conocen como de óxido-reducción y generalmente son catalizadas por metales o grupos prostéticos dentro de las células (Halliwell y Gutteridge, 1999; Konigsberg, 2008). Los radicales libres más significativos a nivel fisiológico son los que contienen oxígeno y se les conoce como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Entre las ROS más importantes se encuentran el anión o radical superóxido ( $O_2\cdot^-$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) no es propiamente un radical libre, sino un generador de radicales libres (Hansberg-Torres, 2002). Todos ellos se tratarán a mayor profundidad en el siguiente capítulo.

Normalmente, el desenlace final de las reacciones donde participan ROS son la oxidación y el daño de varias macromoléculas, principalmente el ADN, las proteínas y los lípidos (Hermes-Lima, 2004). Por ello, la teoría de Harman propone que la acumulación de dichas moléculas dañadas que no se reparan durante la vida de los organismos es lo que se asocia con el deterioro durante el envejecimiento.

### Mitocondria y generación de energía

La mitocondria es el organelo que se encarga de proveer a las células de la energía necesaria para funcionar y lo hace en forma de ATP. Para sintetizar ATP, la mitocondria utiliza el poder reductor del NADH generado principalmente por la oxidación de los carbohidratos durante la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o de Krebs, en lo que se conoce como cadena respiratoria mitocondrial (CRM) (Königsberg, 1992).

La CRM (figura 1) está constituida por cuatro complejos proteicos (I-IV) que se encuentran embebidos dentro de la membrana interna mitocondrial y que gracias a la ayuda de transportadores de electrones, como la ubiquinona (UQ) y el citocromo c, se encargan de transferir electrones desde el NADH hasta el oxígeno molecular para formar agua. Aunada a la transferencia de electrones, hay una translocación o liberación de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, lo cual genera un gradiente de cargas debido a la carga positiva de los protones que van saliendo, y un gradiente de pH también propiciado por la translocación de protones. A estas diferencias o gradientes se les conoce como potencial electroquímico de protón ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ), y constituyen una fuerza que es utilizada por la enzima ATP sintasa o complejo V para generar y liberar al ATP. Cuando la CRM se encuentra acoplada al complejo V para la

síntesis de ATP, se le conoce como fosforilación oxidativa (OXPHOS). El transporte de los electrones a través de los complejos mitocondriales debe realizarse de uno en uno, por lo que los complejos poseen grupos prostéticos y metales que les permiten llevar a cabo las reacciones de óxido-reducción que se mencionaron arriba. Sin embargo, la CRM no es cien por ciento eficiente y algunos de esos electrones pueden fugarse y ser atrapados por el  $\text{O}_2$  para generar al radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot$ ). Ahora se sabe que la mitocondria utiliza aproximadamente 95% del oxígeno consumido por las células y que de éste, aproximadamente de 0.1 a 0.5% genera radicales libres *in vivo* durante el proceso normal de la CRM (Kowaltowski *et al.*, 2009).

### ROS que se producen en la mitocondria

Como se mencionó antes, la primera ROS que se produce en la mitocondria es el  $\text{O}_2\cdot$ , que se genera cuando hay una fuga de un electrón solo o sin pareja. Ese electrón es atrapado por el  $\text{O}_2$ , el cual se reduce y forma al  $\text{O}_2\cdot$ . Posteriormente, gracias a la actividad de la enzima superóxido dismutasa II o de manganeso (Mn-SOD) que se encuentra en la matriz mitocondrial, o bien por la superóxido dismutasa I o de cobre-zinc (Cu/Zn-SOD) que se encuentra en el espacio intermembranal, el  $\text{O}_2\cdot$  es transformado en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que por no ser un radical libre es mucho más estable. El problema con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es que por ser tan estable puede atravesar las membranas de la mitocondria, o bien ser

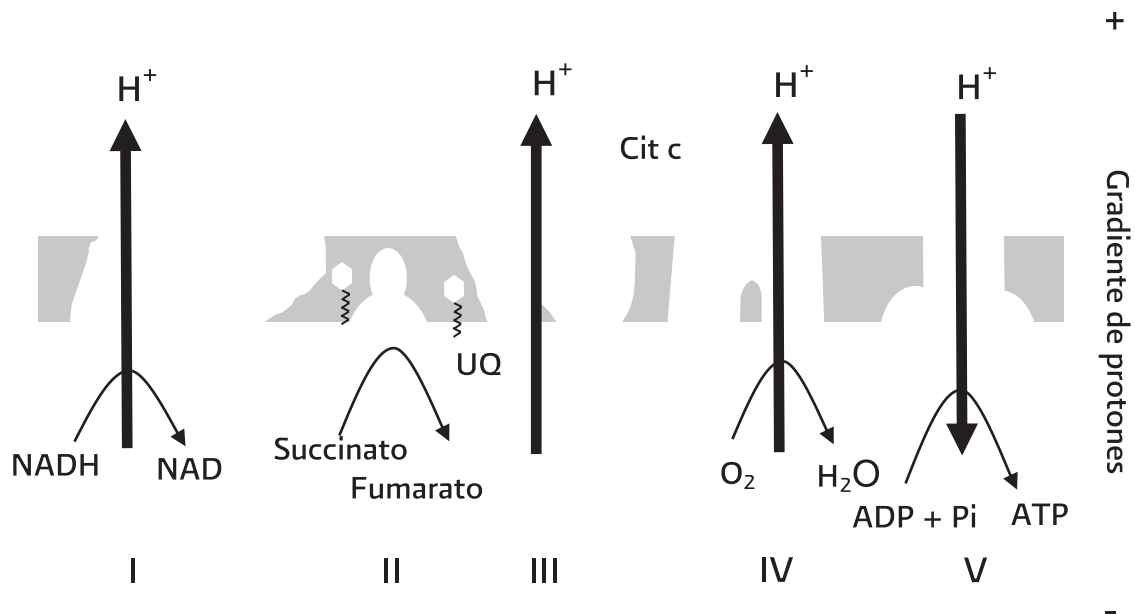


Figura 1. OXPHOS. Se observan los cuatro complejos de la CRM más la enzima ATP sintasa, así como los tres sitios de acoplamiento donde hay translocación de protones para generar el  $\Delta\mu\text{H}^+$ .

transportado por acuaporinas (Lee y Thévenod, 2006) y difundir a diversos destinos dentro de la célula (Bienert *et al.*, 2006). El  $H_2O_2$  puede ser eliminado por varias enzimas antioxidantes en el citosol como son las catalasas (Peraza-Reyes, 2008), peroxidasas (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008) y tiorredoxinas (Hernández y Bucio, 2008), pero también puede fungir como segundo mensajero, afectando múltiples vías de transducción de señales, como las que regulan al ciclo celular, la respuesta al estrés, el metabolismo energético y el balance redox, entre otras. Asimismo, el  $H_2O_2$  en presencia de metales puede generar un radical libre mucho más dañino; el radical  $\bullet OH$ , en una reacción conocida como reacción de Fenton. Para evitar la reacción de Fenton y la generación del  $\bullet OH$ , la mitocondria ha desarrollado un sistema muy eficiente para eliminar al  $H_2O_2$  y para mantener secuestrados o quelados a los metales de transición. Sin embargo, cuando la mitocondria pierde su integridad, o durante alguna patología, puede convertirse en una fuente importante de ROS (Kowaltowski *et al.*, 2009).

La mitocondria también se ha señalado como una fuente de especies reactivas de nitrógeno (RNS), en particular las derivadas del óxido nítrico ( $NO\bullet$ ). El  $NO\bullet$  es generado enzimáticamente por la familia de óxido nítrico sintetasas (NOS). La existencia de una NOS mitocondrial es aún controversial (Giulivi, 2003).

La producción de ROS en la mitocondria ocurre a tasas relativamente más altas que las producidas a nivel citosólico. Sin embargo, a diferencia de las ROS que se producen en otros compartimentos celulares, y que se han relacionado con la inducción de señalización celular y activación de vías metabólicas, la generación de ROS mitocondriales generalmente se ha interpretado como un malfuncionamiento de la CRM y se ha asociado con procesos dañinos o patológicos, y sólo ahora se ha empezado a estudiar la relación con otro sistema productor de ROS a nivel celular, como es la enzima NADPH oxidasa y su función en la señalización celular.

Aunque desde hace más de 40 años se logró identificar la producción de  $H_2O_2$  a nivel mitocondrial, aún no se sabe a ciencia cierta en qué parte de la CRM exactamente se fugan los electrones que llegan hasta el  $O_2$  para producir  $O_2\bullet$  (Herrera y Barja, 2000; Turrens, 2003). En un inicio se pensó que esta molécula se originaba en el complejo IV,

citocromo c oxidasa, ya que por ser el componente terminal de la CRM reduce una molécula de  $O_2$  a dos moléculas de  $H_2O$  en un proceso que involucra la transferencia de cuatro electrones de manera independiente (no en pares). Sin embargo, se sabe que los grupos prostéticos que componen al complejo IV están muy bien adaptados a este tipo de reacciones y no se ha observado liberación de electrones a este nivel. Al contrario, se ha sugerido que la enzima citocromo c oxidasa a veces puede funcionar como un antioxidante mitocondrial oxidando de regreso al  $O_2\bullet$  y reconvirtiéndolo en  $O_2$  (Mattiasson, 2004).

Aparentemente, los complejos que están involucrados en la formación del  $O_2\bullet$  son el I y el III, y la contribución de cada sitio varía dependiendo del órgano, del tejido, y también de la actividad respiratoria mitocondrial y del sustrato que utilicen. Al parecer, el complejo III es el responsable de la mayor producción de  $O_2\bullet$  en las mitocondrias de corazón y pulmón (Nohl *et al.*, 2005); mientras que el complejo I es aparentemente la fuente principal de este radical en el cerebro en condiciones normales (Kushnareva *et al.*, 2002; Galkin y Brandt, 2005). Sin embargo, el complejo I también parece ser la fuente principal de radicales en una gran cantidad de patologías que van desde la enfermedad de Parkinson hasta el envejecimiento (Genova *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 2005). Debido a la importancia de la producción de ROS mitocondriales durante el proceso del envejecimiento, se ha sugerido reformular la teoría del envejecimiento de Harman, proponiendo que los daños oxidativos que se acumulan durante el envejecimiento sean principalmente los relacionados con la mitocondria.

### Mitocondria y apoptosis

Si bien la producción de ROS es una de las propiedades que asocian a la mitocondria con el envejecimiento, existen otras características que también juegan papeles preponderantes en este proceso y que no pueden dejarse de lado. Desde hace ya varios años, se ha reconocido que los niveles de muerte celular programada o apoptosis se encuentran elevados durante el envejecimiento de células y tejidos. La pérdida masiva de células contribuye de manera significativa a la patogénesis de una gran cantidad de enfermedades. La importancia de la mitocondria como mediadora fundamental en la apoptosis es ampliamente reconocida, y aunque los detalles de esta vía quedan fuera del alcance del presente capítulo, habrá que mencionar algunos puntos importantes en relación al envejecimiento.

La mitocondria es un regulador de los niveles de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) citosólico. Una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol representa un reto para la supervivencia celular, ya que es un activador de una gran cantidad de proteasas y fosfolipasas que pueden inducir la muerte. En condiciones normales, una gran parte del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está localizado dentro del retículo endoplásmico (RE), sin embargo, cuando éste sale del RE, el incremento en los niveles citosólicos induce grandes afluencias de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la matriz mitocondrial. Este mecanismo al parecer se encuentra regulado por proteínas de la familia de Bcl-2 que se encuentran ancladas tanto en la membrana externa mitocondrial, como en la membrana del RE (Danial y Korsmeyer, 2004; Distelhorst y Shore, 2004); así como por la existencia de sitios de contacto entre la mitocondria y el RE (Hayashy *et al.*, 2009). Ahora bien, la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial causa una variedad de respuestas dependiendo de los niveles alcanzados, que van desde una estimulación del metabolismo hasta la inducción misma de la apoptosis. Un exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  puede generar hinchamiento y fragmentación mitocondrial, o bien, la apertura del poro PTP; ambos eventos pueden inducir la salida de factores que inicien el proceso de apoptosis y que de manera normal se encuentran en la matriz mitocondrial, como son el citocromo c y el factor inductor de la apoptosis (AIF), entre otros (Kowaltowski *et al.*, 1996; Payne *et al.*, 2009) (figura 2).

Se sabe que las ROS generadas en la mitocondria pueden inducir la apoptosis celular, pero también las ROS producidas en otros compartimientos celulares pueden llegar a la mitocondria e iniciar el proceso de muerte (Mammucari y Rizzuto, 2010). En particular, se ha prestado una gran atención a la proteína p66shc en la apoptosis y el envejecimiento. P66shc es una proteína que se asocia con el aumento de los niveles de ROS y el mantenimiento de un estado oxidado dentro de la célula. Entre sus funciones se encuentran la de inhibir enzimas antioxidantes como catalasa y superóxido dismutasa, así como incrementar el metabolismo energético promoviendo la fuga de electrones vía la CRM. P66shc se encuentra en el citosol y en condiciones oxidantes es fosforilada por la cinasa PKC $\beta$ , lo cual induce su translocación a la mitocondria, incrementando los niveles de ROS y fomentando la apoptosis. Hace algunos años se encontró que los ratones en los que se logró eliminar al gen que codifica para dicha proteína (p66shc -/-) tuvieron

una mejor resistencia al estrés oxidante y un aumento en su longevidad de 30% (Trinei *et al.*, 2009). Es por ello que en un inicio se le consideró como una proteína que inducía el envejecimiento.

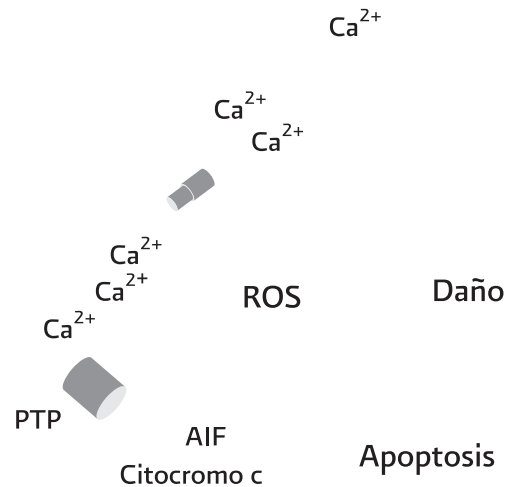


Figura 2. Participación del RE y el  $\text{Ca}^{2+}$  en la muerte celular por apoptosis.

### Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son organelos dinámicos que pueden cambiar su forma y su tamaño dependiendo de las necesidades funcionales y metabólicas de las células. Actualmente se reconoce que las mitocondrias llevan a cabo ciclos continuos de fusión y fisión, y que el balance entre estos eventos opuestos, conocido como dinámica mitocondrial, es lo que determina la morfología del organelo (Otera y Mihara, 2011).

En la década de los noventa se descubrieron varios componentes responsables de la dinámica mitocondrial en levaduras (Hoppins *et al.*, 2007) y recientemente sus homólogos han sido encontrados en mamíferos. Se han reportado tres proteínas importantes involucradas en la fusión de mitocondrias de mamífero, todas ellas de la familia de las dinaminas y con actividad de GTPasa. Las dos primeras están involucradas en la fusión de la membrana externa mitocondrial (MEM) y se conocen como mitofusina 1 (Mfn1) y mitofusina 2 (Mfn2). Ambas se encuentran ancladas a la MEM a través de

su C-terminal, mientras que el dominio con actividad de GTPasa se encuentra en el lado N-terminal y es citoplásmico. Las proteínas Mfn llevan a cabo la fusión de la MEM inmovilizando la membrana mitocondrial opuesta. Una vez unidas las MEM, se unen las membranas internas mitocondriales (MIM) permitiendo la interacción entre los componentes intramitocondriales. El mecanismo de fusión de las MIM es controlada por la otra GTPasa distinta denominada Opa1 (del inglés *optic atrophy protein 1*) (Liesa et al., 2009; Westermann, 2010).

Por otro lado, el mecanismo de fisión es regulado principalmente por la proteína relacionada a la dinamina 1 (*dynamamin-related protein 1 o Drp1*), que también posee actividad de GTPasa (Seo et al., 2010).

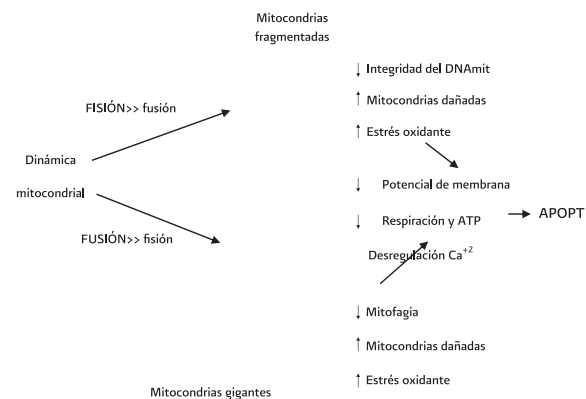


Figura 3. Alteraciones en la dinámica mitocondrial durante el envejecimiento.

Existe una gran cantidad de evidencia experimental que asocia al mal funcionamiento o deterioro de la dinámica mitocondrial con el surgimiento de enfermedades neurodegenerativas (Hansruedi, 2010; Cho et al., 2010), desórdenes metabólicos como diabetes (Yoon et al., 2011) y envejecimiento (Seo et al., 2010). Se ha propuesto que alteraciones en las proteínas relacionadas con la fisión mitocondrial modifican la permeabilidad de la MEM provocando la pérdida del potencial de membrana, lo cual permite la liberación de las moléculas proapoptóticas ya mencionadas, e induciendo a la pérdida masiva de células. La disfunción en la dinámica mitocondrial puede resultar de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas de fusión y fisión, pero también se han reportado modificaciones postranscripcionales, por ejemplo para el caso de Opa1, en donde se generan diferentes isoformas

por *splicing* alternativo (Delettre et al., 2001). Para complicar el panorama, se sabe que los niveles de Opa1 son también controlados por rompimiento proteolítico y que los fragmentos resultantes pueden ser reguladores de la muerte celular por apoptosis (Duvezin-Caubet et al., 2006).

### Mutaciones en el ADN mitocondrial

Las mitocondrias son los únicos organelos dentro de las células animales que poseen su ADN propio, al parecer una reminiscencia de su origen como organismos independientes (Margulis y Sagan, 1986). En cada mitocondria existen múltiples copias del ADN mitocondrial (ADNmit). En humanos, el ADNmit es una doble cadena circular y codifica únicamente para 13 subunidades de los complejos de la CRM, así como para 22 ARNs de transferencia y 2 ARNs ribosomales. El resto de las subunidades de los complejos mitocondriales, así como las otras proteínas requeridas para su funcionamiento, están codificados en el ADN genómico en el núcleo, son sintetizados en el citosol y deben ser transportados de manera activa hacia la mitocondria (Anderson et al., 1981; Vendelbo y Fair, 2011).

El ADNmit no tiene histonas, pero sí forma una estructura con proteínas llamada nucleoide que lo protege del daño oxidativo y otro tipo de daños, sin embargo, no es tan eficiente como las histonas. Los daños más frecuentes reportados al ADN son oxidación de bases, principalmente 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8OHdG), FapyG, FapyA y timinglicol; además de mutaciones puntuales, deleciones y rompimientos de hebras (Medeiros, 2009). Existe una gran cantidad de estudios donde se ha encontrado que las células viejas de diferentes tejidos, especialmente las posmitóticas, acumulan tanto mutaciones como deleciones en el ADNmit. También se ha encontrado que este tipo de alteraciones se relacionan con menor longevidad, así como con la aparición de enfermedades asociadas a la edad (Wallace, 2010). Por lo que se propuso que el daño al ADNmit pudiera ser un factor que por sí mismo indujera el envejecimiento.

Por muchos años, este tipo de propuestas se veían objetadas debido a que las mutaciones en el ADNmit, que inducen alteraciones en la CRM, también producen incrementos en ROS, por lo que se pensaba que los radicales libres pudieran ser las moléculas causantes del

daño que promoviera el envejecimiento y no el daño al ADNmit por sí mismo. Sin embargo, el año pasado se desarrolló un modelo de ratón conocido como el Mutator Mouse; este ratón tiene mutada o eliminada la parte de la enzima ADN polimerasa  $\gamma$  (POLG) que se encarga de corregir las secuencias alteradas en el ADNmit, dando como resultado animales con numerosas mutaciones y, por lo tanto, fallas en el funcionamiento de la CRM. Los animales mutantes mostraron signos de envejecimiento prematuro como osteoporosis, alopecia, pérdida de peso, disminución en la capacidad reproductiva, aumento en el tamaño del corazón, además de que redujeron su expectativa de vida (Trifunovic *et al.*, 2004). No obstante, no se encontró un aumento en las ROS ni daño oxidativo de las macromoléculas, indicando que las mutaciones en el ADNmit promueven el envejecimiento independientemente de la generación de ROS (Czarnecka y Bartnik, 2011). Otra objeción importante era si las mutaciones en el ADNmit durante el envejecimiento normal eran suficientes para causar las alteraciones necesarias en la respiración mitocondrial, y tales que indujeran envejecimiento.

Para entender lo anterior hay que recordar que cada mitocondria tiene un número variable de copias de ADNmit, y que cada célula tiene numerosas mitocondrias, lo que hace que cada célula tenga cientos de copias de ADNmit. Esto implica que el daño en una sola copia de ADNmit no tendrá relevancia fisiológica en la célula y sólo conllevará a un deterioro en la función mitocondrial si el número de copias dañadas se encuentra arriba de cierto nivel umbral. Este fenómeno es conocido y estudiado en las enfermedades mitocondriales congénitas como heteroplasmia mitocondrial, y se refiere a la distribución dispareja del ADNmit mutado entre las células de un tejido, lo que generalmente crea un patrón de tipo mosaico en esa clase de pacientes. Aunque existan mutaciones o deleciones en el ADNmit, las copias pueden tener una segregación azarosa en los diferentes tejidos somáticos y manifestarse como enfermedades distintas dependiendo del tipo celular en el que se encuentren (Wallace, 2010). El grupo del Dr. Larsson desarrolló una quimera entre un ratón normal y un ratón conocido como MILON, al cual se le eliminó el factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) en la neocorteza e hipocampo, lo cual llevó a la pérdida progresiva de la funcionalidad de la CRM, neurodegeneración y muerte prematura.

Los estudios con estos ratones quimeras demostraron que una muy baja proporción de neuronas con CRM deficiente (tan sólo 20%) era suficiente para causar los síntomas clínicos y la muerte prematura de los animales, demostrando así que mutaciones puntuales, aunque sean pocas y se manifiesten de manera azarosa, pueden tener consecuencias devastadoras (Dufour *et al.*, 2008). Por todo lo anterior, ahora se ha aceptado que las mutaciones en el ADNmit están involucradas en el proceso del envejecimiento de una manera directa e independiente de las ROS generadas (Czarnecka y Bartnik, 2011).

### Mitofagia

La célula posee una gran variedad de mecanismos de reparación y renovación que le permiten lidiar contra daños como los producidos por las ROS y por otros agentes. Uno de ellos es el proceso de autofagia, en el cual la célula se encarga de degradar componentes intracelulares dañados o inservibles, como pueden ser proteínas mal plegadas u organelos completos como la mitocondria. Más adelante, en otro capítulo se tratará el papel de la autofagia en el envejecimiento.

Dado que las mitocondrias son fuentes sustanciales de ROS y, al mismo tiempo, son blancos de ellas, es común que estos organelos acumulen daño oxidativo tanto en su ADN, como en las proteínas y los lípidos que las componen, y requieran por lo tanto ser eliminadas por la célula cuando se encuentren sumamente dañadas y sean ineficientes. Para deshacerse de ellas, la célula cuenta con un sistema de degradación particular denominado mitofagia, por el cual se eliminan las mitocondrias con daño en el ADNmit o deficientes en producción de energía, y que de no hacerlo podrían llevar la muerte por apoptosis. De esta manera, la célula asegura que la población mitocondrial existente sea funcional.

Se considera que la eliminación de mitocondrias defectuosas representa un proceso protector que retrasa el envejecimiento y la aparición de enfermedades neurodegenerativas, y que cuando se encuentra imposibilitado favorece la aparición de las mismas. Un ejemplo de ello es la pérdida de la función de una proteína llamada Parkina durante la enfermedad de Parkinson. La Parkina es una ubiquitin ligasa que recluta de manera selectiva a las mitocondrias disfuncionales debido al bajo potencial de membrana que tienen éstas e induce su

degradación mitofágica; por ello se ha sugerido que, al menos en parte, la enfermedad de Parkinson está asociada a la incapacidad celular de eliminar las mitocondrias disfuncionales (Narendra *et al.*, 2010).

La regulación de la mitofagia también está íntimamente ligada a la dinámica mitocondrial, en particular al proceso de fisión. Puesto que se sabe que un requisito para que se lleve a cabo la autofagia es la fragmentación de los organelos, las mitocondrias pequeñas o fragmentadas pueden ser más fácilmente degradadas. De manera consistente, se ha propuesto una relación entre el envejecimiento y la dinámica mitocondrial, reportándose, por ejemplo, un aumento del tamaño mitocondrial de las células de animales viejos, llamadas mitocondrias gigantes. Estas mitocondrias se caracterizan por tener bajos niveles de producción de ATP, pérdida de las crestas mitocondriales y una morfología hinchada, y se ha reportado que pueden inducir senescencia celular. Aparentemente, las mitocondrias gigantes correlacionan con una dinámica mitocondrial alterada y una mitofagia deficiente; esto concuerda con los bajos niveles de la proteína de fisión Opa1 observados en animales viejos. Asimismo se ha reportado que, en respuesta a daño oxidativo, la fisión mitocondrial se altera dando como resultado dos mitocondrias hijas con diferente potencial de membrana, de las cuales solo la que tiene un bajo potencial de membrana puede ser marcada para degradación y la otra, aunque alterada e inservible, permanece en la célula posiblemente contribuyendo al desarrollo de estados patológicos y envejecimiento (Raffaello y Hirsuto, 2011).

A lo largo de este capítulo se ha destacado la importancia de la mitocondria durante el proceso del envejecimiento, pero para entender la magnitud y alcance de lo que ello implica hay que relacionarlo con otros procesos como la pérdida en la obtención de energía, la muerte por apoptosis, la autofagia, la degradación de proteínas vía proteosoma y lisosoma y el estrés del retículo endoplásmico, etc. Es decir, el envejecimiento no es un proceso que se pueda llevar a cabo solo por un organelo, sino que habrá que estudiarlo de una manera más amplia e incluyente. Por ello, en el futuro probablemente se llevarán a cabo estudios donde se analicen los efectos relacionando todas estas condiciones. Además, es posible que se encuentren mecanismos o vías

celulares que se activen o se inhiban en función del estado redox promovido por las ROS mitocondriales, por lo que no será de sorprender el que las mitocondrias vuelvan a tomar un papel preponderante en los estudios futuros.

1. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981;290:457-465.
2. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*, 2006;1758:994-1003.
3. Cárdenas-Rodríguez N, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri, J. Glutatón peroxidasa: una familia de enzimas. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Ed. Konigsberg M. México: El Manual Moderno. 2008. ISBN-10:970-729-321-7. 201-217.
4. Cho DH, Nakamura T, Lipton SA. Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci*, 2010;67:3435-3447.
5. Czarnecka AM, Bartnik E. The Role of the Mitochondrial Genome in Ageing and Carcinogenesis. *J Aging Res*, 2011; Article ID136435:1-10.
6. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*, 2004; 116:205-219.
7. Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet*, 2001;109:584-591.
8. Distelhorst CW, Shore GC. Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface. *Oncogene*, 2004;23:2875-2880.
9. Dufour E, Terzioglu M, Sterky FH, Sörensen L, Galter D, Olson L, Wilbertz J, Larsson NG. Age-associated mosaic respiratory chain deficiency causes trans-neuronal degeneration. *Hum Mol Gen*, 2008;171418-171426.
10. Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, Hofmann S, Trifunovic A, Hansson A, Chomyn A, Bauer MF, Attardi G, Larsson NG, Neupert W, Reichert AS. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol*



- Chem, 2006;281:37972-37979.
11. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000;408:239-245.
  12. Galkin A, Brandt U. Superoxide radical formation by pure complex I (NADH: Ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem*, 2005;280:30129-30135.
  13. Genova ML, Pich MM, Biondi A, Bernacchia A, Falasca A, Bovina C, Formiggini G, Castelli GP, Lenaz G. Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of coenzyme Q as an antioxidant. *Exp Biol Med*, 2003;228:506-513.
  14. Giulivi C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic Biol Med*, 2003;34:397-408.
  15. Halliwell B, Gutteridge MC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. Nueva York: Oxford University Press Inc. 1999.
  16. Halliwell B, Gutteridge MC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 1984;219:1-14.
  17. Hansberg-Torres W. Biología de las especies de oxígeno reactivas, en: el mensaje bioquímico. México: Depto. de Bioquímica. Fac. Medicina, UNAM. 2002:19-54.
  18. Hansruedi B. Mitochondrial dynamics, cell death and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis*, 2010;15:1336-1353.
  19. Harman D. Ageing: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300.
  20. Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol*, 2009;19:81-88.
  21. Hernández E, Bucio L. Tiorredoxinas, en: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Ed. Konigsberg M. México: El Manual Moderno. 2008. ISBN-10:970-729-321-7. 219-232.
  22. Hermes-Lima M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals; en: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, Ed. Kenneth B. Storey. E.U.A.: John Wiley & Sons, Inc. 2004: 319-368.
  23. Herrera A, Barja G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of Heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomemb*, 2000;32:609-615.
  24. Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 2007;76:751-780.
  25. Kirkwood TB. Comparative life spans of species: why do species have the life spans they do? *Am J Clin Nutr*. 1992; 55:1191S-1135S
  26. Konigsberg M. (ed.) *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. México: El Manual Moderno, 2008; 636pp. ISBN-10:970-729-321-7
  27. Konigsberg M. *Bioenergética de la cadena respiratoria mitocondrial*. México: UAM-I. Libros de Texto y Manuales de Prácticas. 113pp. 1992; ISBN: 970-620-061-4
  28. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca<sup>2+</sup> is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett*, 1996; 378:150-152.
  29. Kowaltowski AJ, Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 2009;47:333-343.
  30. Kushnareva Y, Murphy A.N, Andreyev A. Complex I mediated reactive oxygen species generation: modulation of cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem J*, 2002;368:545-553.
  31. Lee WK, Thévenod F. A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and death decisions? *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006; 291:195-202.
  32. Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev*, 2009; 89: 799-845.
  33. Mammucari C, Rizzuto R. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech Age Dev*, 2010;131:536-543.
  34. Margulis L, Sagan C. *Microcosmos*. Nueva York: Summit Books. 1986; ISBN 0671441698
  35. Mattiasson G. Analysis of mitochondrial generation and release of reactive oxygen species. *Cytometry Part A*, 2004;62A: 89-96.
  36. Medeiros MH. Exocyclic DNA adducts as biomarkers of lipid oxidation and predictors of disease. Challenges in developing sensitive and specific methods for clinical studies. *Chem Res Toxicol*, 2009;22:419-425.
  37. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Bio*, 2010; 8:e1000298.

38. Nohl H, Gille L, Stainek K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 2005;69:719-723.
39. Otera H, Mihara K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J Biochem*, 2011;149:241-251.
40. Payne AM, Jimenez-Moreno R, Wang ZM, Messi ML, Delbono O. Role of Ca<sup>2+</sup>, membrane excitability, and Ca<sup>2+</sup> stores in failing muscle contraction with aging. *Exp Gerontol*, 2009; 44:261-273.
41. Peraza-Reyes L. Catalasa, en: Ed. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Ed. Konigsberg M. México: El Manual Moderno. 2008. ISBN-10:970-729-321-7. 183-200.
42. Raffaello A, Rizzuto R. Mitochondrial longevity pathways, *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:260-268.
43. Sanz A, Caro P, Ibañez J, Gómez J, Gredilla R, Barja G. Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J Bioenerg Biomemb*, 2005;37:83-90.
44. Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang YC, Aris JP, Leeuwenburgh C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci*, 2010;123:2533-2542.
45. Simons K, Mukundan A, Dewundara S, Van Remmen H, Dombkowski A, Cabelof DC. Transcriptional profiling of the age-related response to genotoxic stress points to differential DNA damage response with age. *Mech Age Develop*, 2009;130:637-647.
46. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly YM, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Törnell J, Jacobs JT, Larsson NG. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 2004;429:417-423.
47. Trinei M, Berniakovich I, Beltrami E, Migliaccio E, Fassina A, Pelicci PG, Giorgio M. P66Shc signals to age. *Aging*, 2009;6:503-510.
48. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 2003;2:335-344.
49. Vendelbo MH, Fair KS. Mitochondrial longevity pathways. *Biochim Biophys Acta*, 2011;1813:634-644.
50. Wallace DC. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*, 2010;51:440-450.
51. Wei YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998;217:53-63.
52. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:872-84.
53. Yoon Y, Galloway CA, Jhun BS, Yu T. Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid Redox Signal*, 2011;14:439-457.

### **Mina Konigsberg**

Realizó la licenciatura y maestría en Biología Experimental, así como el doctorado en Ciencias Biológicas, en la UAM-Iztapalapa. Es profesora titular del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM-I, en donde dirige el laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular. Ha sido directora de tesis de alumnos de licenciatura, maestría y doctorado y fue coordinadora del posgrado en Biología Experimental en la misma institución de 2007 a 2010. Autora de varios artículos científicos y de divulgación, además de libros de texto; editora del primer libro sobre radicales libres y estrés oxidante en América Latina. En 2010-2011 fue distinguida con la beca Fulbright para realizar una estancia de investigación en el Barshop Institute for Aging and Longevity en Texas, Estados Unidos. Actualmente es miembro de Sistema Nacional de Investigadores, nivel I.

**Armando Luna López**

Departamento de Investigación Básica, Instituto  
de Geriátria. Secretaría de Salud.

[allbioexp@yahoo.com](mailto:allbioexp@yahoo.com)

El envejecimiento puede definirse como la disminución de las funciones fisiológicas, bioquímicas y moleculares de un individuo a lo largo de la vida de un individuo. Durante décadas se ha relacionado al envejecimiento con el daño oxidante generado por las ERO, que son producidas por el metabolismo aeróbico de los organismos. Las defensas antioxidantes que han desarrollado los organismos aeróbicos resultan ser insuficientes a los retos ambientales y propios del metabolismo, de tal manera que se genera un desbalance conocido como estrés oxidante. Este desbalance tiene como consecuencia daños oxidantes en las principales biomoléculas, como lo son lípidos, proteínas y ADN. El daño oxidante principal es en el ADN nuclear ya que, al alterarse las secuencias génicas, se disminuyen las funciones fisiológicas y estructurales de los individuos. Existen diferentes daños al ADN como los rompimientos de SSB y DSB, las mutaciones, y la producción de aductos de ADN. Entre los sistemas de reparación del ADN que se han reportado por estar relacionados con el envejecimiento se encuentran el MMR, BER y la enzima ATM.

### **Especies reactivas de oxígeno**

Los radicales libres (RL) pueden ser definidos como átomos o moléculas con uno o más electrones desapareados en alguno de sus orbitales electrónicos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Este electrón es, generalmente, el que le proporciona su alta capacidad reactiva. El oxígeno molecular (dioxígeno) tiene una configuración electrónica única y es por sí mismo considerado un radical, por lo que los RL derivados del oxígeno producidos por los seres vivos son considerados los radicales más importantes (Miller *et al.*, 1990). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son ubicuas, altamente reactivas, de tiempo de vida media muy corto, se producen en el metabolismo del oxígeno en los sistemas biológicos aeróbicos y reaccionan con las moléculas que se encuentran a su alrededor empezando con aquellas que se encuentran muy cercanas a su sitio de formación. Las ERO incluyen al radical superóxido ( $O_2\cdot$ ), al radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) y al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Además habría que considerar entre las ERO a las especies reactivas de nitrógeno (ERN), que poseen tanto átomos de oxígeno como de nitrógeno e incluyen al óxido nítrico (NO) y al radical peroxinitrito ( $ONOO\cdot$ ), entre las más importantes. Las ERN también participan en diferentes procesos biológicos como en el funcionamiento

de los tejidos vasculares. Las ERO/ERN han sido consideradas dañinas por su reactividad, sin embargo, bajos niveles de éstas son necesarios para que se lleven a cabo diferentes procesos bioquímicos, entre los que se encuentran la señalización intracelular, la diferenciación, el control del ciclo, la apoptosis, el sistema inmune y la defensa contra los microorganismos (Ghosh, 1998; Tohyama y Yamamura, 2004; Bae *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998).

### **Antioxidantes**

La exposición a las ERO producidas por los procesos fisiológicos o ambientales ha llevado a los organismos a desarrollar mecanismos de defensas (Cadenas, 1997). Los organismos se protegen contra el estrés oxidante inducido por las ERO con mecanismos que pueden ser preventivos, de reparación, defensas físicas y defensas antioxidantes.

Este último es uno de los más importantes y está compuesto por enzimas antioxidantes entre las que se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT) y otros no enzimáticos entre los que se encuentran el ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -Tocoferol (vitamina E), glutatión reducido (GSH), carotenoides, flavonoides y otros antioxidantes.

En algunos tipos celulares, las ERO pueden causar la muerte celular vía apoptosis y/o necrosis, lo cual pueden ser disminuido o eliminado por los sistemas antioxidantes (Carmody y Cotter, 2001; Kim *et al.*, 2001; Jang y Surh, 2003). La concentración de ERO y el microambiente celular parecen ser importantes en determinar el tipo de muerte celular (Kim *et al.*, 2001). En condiciones normales siempre existe un balance entre las ERO y las defensas antioxidantes para que los organismos se encuentren en homeostasis.

### **Estrés oxidante**

Las ERO son producidas en todos los organismos aeróbicos y normalmente están en la célula en un estado balanceado con las moléculas antioxidantes. El estrés oxidante se presenta cuando este balance es perturbado por la falta de antioxidantes, por la generación excesiva de ERO, o por ambas. Así que, cuando los antioxidantes se encuentran en bajas proporciones y/o se incrementa la formación de ERO, se incrementa la respuesta celular

para tratar de contrarrestar este evento hasta que se pueda controlar; cuando la célula no lo puede controlar, entonces activa el proceso de muerte. El estrés oxidante puede generar un ambiente muy adverso o condiciones extremas en los sistemas biológicos. Un rápido indicador de que el sistema se encuentra en estrés oxidante es el incremento en la respuesta antioxidante y/o un incremento en los niveles de ERO endógenos. La formación de ERO se incrementa como una consecuencia de diferentes condiciones de estrés ambiental, entre las que se encuentran la radiación electromagnética UV, la exposición a herbicidas, temperaturas extremas, toxinas como la cercosporina y aflatoxina, contaminantes ambientales, metales y xenobióticos. Cuando el estrés oxidante se presenta, la función de la célula es contrarrestar los efectos oxidantes y restaurar el balance redox tratando de alcanzar los parámetros homeostáticos. Este último evento de la respuesta celular puede activar o silenciar genes que codifican para enzimas de defensa, factores de transcripción y proteínas estructurales (Dalton *et al.*, 1999; Scandalios, 2004).

En los eucariontes superiores, tanto plantas como animales, la respuesta al estrés oxidante es muy compleja y está modulada por diferentes reguladores (Scandalios, 1997). El estado redox dependiente de ERO que modifica el reciclamiento de los tioles de los residuos de cisteínas es sumamente importante para establecer las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN, que son fundamentales para los procesos de transducción de señales y para la regulación de la actividad de algunos factores de transcripción (Dalton *et al.*, 1999; Scandalios, 2004; Storz e Imlay, 1999; Kiley y Storz, 2004; Ruis y Schuller, 1995; Moradas-Ferreira y Costa, 2000; Delaunay, Isnard y Toledano, 2000), como es el caso de la activación del factor NF- $\kappa$ B y la proteína AP-1, conocidos por tener una participación fundamental en procesos como la proliferación, diferenciación y morfogénesis, los cuales pueden ser estimulados por diferentes agentes que convergen en un mecanismo común que involucra la producción de ERO. Un mecanismo que se ha descrito es que al incrementarse la producción de  $H_2O_2$  se tiene como consecuencia la activación redox de NF- $\kappa$ B y en el cual participa una forma activa de la proteína Rho que es una GTPasa que responde a la modificación del estado redox celular (Gabbita *et al.*, 2000). Las fuentes de ERO, tanto extracelulares como intracelulares, son capaces

de modular la expresión de genes. Dosis bajas de  $H_2O_2$  ( $<20\mu M$ ) pueden producir cambios en la fosforilación de proteínas reguladoras específicas entre las que se encuentra la proteína cinasa B, también conocida como Akt. La acción directa de la señalización por  $H_2O_2$  en la regulación diferencial de genes antioxidantes en plantas y animales es debida a las interacciones proteína-ADN en la región del elemento de respuesta antioxidante (ARE; TGACTCA), NF- $\kappa$ B y el elemento de respuesta al ácido abscísico (ACGT) en los promotores de estos genes. Además de la inducción de la expresión de genes de defensa, otros papeles del desbalance redox en plantas incluyen muerte directa de patógenos, la modificación de la estructura de la pared celular y la inducción de la muerte celular programada (Scandalios, 1997). En levaduras y animales, el estrés oxidante puede llevar a la detención de la división celular y a la progresión del ciclo celular (Paulovich *et al.*, 1997). Un claro ejemplo de cómo las ERO pueden tener un papel benéfico es el hecho de que el  $O_2\cdot$  desempeña un papel importante en la infección por microbios, en donde su actividad puede ser comparada con la de un antibiótico de amplio espectro (Babior, 1984). En plantas, la respuesta a la invasión por patógenos también involucra un desbalance redox que tiene que ver con un aumento transitorio de grandes cantidades de ERO (Doke, 1997).

El estado de estrés oxidante generado por el incremento de ERO desempeña papeles diferentes y, en ocasiones, opuestos durante diferentes procesos celulares. Por ejemplo, el  $H_2O_2$  puede actuar de una manera relevante en los procesos de transducción de señales por medio de la activación de NF- $\kappa$ B, mientras que en condiciones patológicas de estrés oxidante el  $H_2O_2$  puede inducir la apoptosis o la necrosis. El estado estable de los niveles de ERO en las células es crítico y es determinante para establecer si la célula debe incrementar los niveles de ERO o activar mecanismos que modulen la respuesta antioxidante celular.

### **Estrés oxidante y envejecimiento**

Durante décadas se ha estudiado la relación que existe entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la acumulación de biomoléculas oxidadas, que es una de las características que se presentan durante el proceso de envejecimiento; esta propuesta es una de las más aceptadas para tratar de explicar la disminución en

las funciones fisiológicas, bioquímicas y moleculares que se presentan en el envejecimiento y fue propuesta por Harman en 1956.

Se han realizado numerosos trabajos que apoyan esta teoría, entre los que podemos mencionar a los realizados en nematodos; en ellos se encontró que una mutación en una subunidad del complejo II de la cadena de transporte de electrones, la enzima succinato deshidrogenasa, en donde se incrementó la producción de ERO, disminuyó la respiración y se acortó el tiempo de vida de este organismo especialmente en ambientes con altas concentraciones de oxígeno, demostrando una correlación entre las ERO y el tiempo de vida de un individuo (Ishii *et al.*, 1998). En otro trabajo, en el que se utilizaron moscas como modelo de estudio, se encontró que al disminuirse los niveles de expresión de la enzima superóxido dismutasa tipo II (SOD2), la cual se encuentra localizada en la mitocondria, se disminuía la locomoción y el tiempo de vida (Martin *et al.*, 2009), mientras que al incrementarse los niveles de expresión de SOD2 se incrementa la longevidad de las moscas (Sun y Tower, 1999). En algunos trabajos en mamíferos se ha demostrado que al sobreexpresar la enzima catalasa en la mitocondria, ésta reduce los niveles de estrés oxidante e incrementa el tiempo de vida. Sin embargo, la sobreexpresión de la catalasa en el núcleo o en los peroxisomas no afecta el tiempo de vida, proponiendo que la mitocondria es un participante muy importante en el metabolismo oxidante y en la regulación del tiempo de vida de un organismo (Schriner *et al.*, 2005).

El estrés oxidante es uno de los eventos principales que se encuentra asociado con el daño celular y estrechamente relacionado con la progresión de algunas enfermedades y con el envejecimiento. El daño ocasionado por las ERO es muy extenso e inespecífico y los mecanismos involucrados en la reparación del daño son ubicuos para proteínas, lípidos y ADN. Las proteínas oxidadas son reducidas por enzimas como la metionina sulfóxido reductasa (Alamuri y Maier; 2004) y la sestrina (Budanov *et al.*, 2004), o degradadas en sistemas especializados como el proteosoma o los lisosomas, así como por diferentes proteasas. Los peróxidos de ácidos grasos en los fosfolípidos de las membranas son eliminados por la fosfolipasa A2 y reducidos a alcohol por la enzima glutatión peroxidasa (GPx); sin embargo, cuando los peróxidos reaccionan con metales complejos, se forman diferentes aldehídos como el malondialdehído

y 4-hidroxinonanal, así como otros hidrocarburos como el etano y el pentano; todos ellos son productos finales del proceso de lipoperoxidación. Finalmente, cabe destacar que estos aldehídos pueden reaccionar con los grupos tioles y amino de las proteínas, lo que producirá en éstas un daño estructural y funcional. Entre los daños que se presentan en el ADN se encuentran los rompimientos de cadena, las modificaciones estructurales en las bases nitrogenadas y los diferentes tipos de mutaciones en la secuencia del ADN; estos daños son reparados por diferentes mecanismos como la unión de fragmentos terminales no homólogos (NHEJ), la recombinación homóloga (HR), la reparación por escisión de bases (BER), la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y el sistema de reparación por mal apareamiento (MMR). Se ha reportado que la respuesta en la reparación del ADN juega un papel importante en la estabilidad del genoma, la activación de la apoptosis o la supervivencia y el envejecimiento prematuro.

### **Sistemas de reparación del ADN en el envejecimiento**

El mantenimiento óptimo del ADN nuclear es crítico para el funcionamiento celular, es por ello que los organismos han desarrollado numerosos sistemas de reparación para los diferentes tipos de lesiones que se presentan en el ADN. Los rompimientos de doble cadena (DSB) y los rompimientos de cadena sencilla (SSB) son reparados a través de los sistemas NHEJ y HR, mientras que los daños ocasionados por efecto de las ERO, en donde se producen aductos de ADN como la 8-hidroxidesoxiguanosina, la timina glicol y algunos otros productos de alquilaciones, son reparados a través del sistema BER y NER (Lombard *et al.*, 2005). Finalmente, las mutaciones que se presentan en la secuencia de ADN, que son detectados como malos apareamientos de las cadenas homólogas de éste, son reparadas por el sistema MMR; cabe destacar que las diversas mutaciones (como las inserciones, deleciones, transversiones y transiciones) pueden ser producto del estrés oxidante. Para la reparación del ADN existen diferentes pasos: el primero es la detección de las lesiones del ADN por sensores moleculares, el segundo es la activación de proteínas de señalización que sirven de moléculas transductoras y, finalmente, el tercero es el agrupamiento de las proteínas efectoras de la reparación del ADN. Las ERO producen al aducto 8-hidroxidesoxiguanosina y lesiones DSB, estas últimas son detectadas en el ADN por dos enzimas muy importantes como la ataxia telangiectasia mutada (ATM),

que es una de las proteínas más relevantes en la detección de lesiones DSB, y la 8-hidroxidesoxiguanosina ADN glicosilasa (Ogg-1), que se encarga de sensar al aducto 8-hidroxidesoxiguanosina, así como de activar al sistema BER. Se ha reportado que mutaciones en estas proteínas que participan en la reparación del ADN presentan fenotipos de envejecimiento prematuro.

### **Ataxia telangiectasia mutada (ATM)**

ATM es uno de los principales guardianes de la integridad del genoma. Esta proteincinasa multifuncional es la encargada de organizar intrincadas respuestas celulares al daño en ADN del tipo DSB. La ausencia o la disfunción de ATM origina desórdenes genéticos pleiotrópicos como la ataxia telangiectasia (AT), patologías relacionadas a la degeneración neuronal, inmunodeficiencia, envejecimiento prematuro y susceptibilidad al cáncer (Shiloh y Kastan, 2001). ATM se activa por la aparición de DSB y por la fosforilación de diferentes sustratos involucrados en las respuestas de reparación del ADN, la apoptosis y la detención del ciclo celular; por lo tanto, ATM es una molécula clave en la estabilidad del genoma, incluyendo la reparación del ADN y los sitios de regulación de la detención del ciclo celular. Recientemente, se ha reportado que el estrés oxidante facilita la deficiencia en la función de ATM, lo que sugiere que se encuentra involucrada en la respuesta antioxidante. La presencia de DSB activa a ATM mediante una autofosforilación en el residuo de Ser-1981, produciendo una disociación dimérica (Bakkenist y Kastan, 2003). Aunque el mecanismo preciso de activación de ATM es todavía incierto, se ha reportado que el complejo Mre11/Rad50/Nbs1 está involucrado en la autofosforilación de ATM (Lee y Paull, 2005). ATM activada es una cinasa que se caracteriza por fosforilar a la proteína fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3K) en su región carboxilo terminal, además de fosforilar numerosas proteínas como H2AX, una de las isoformas de histonas que forman el nucleosoma como H2A; la proteína p53, la cual juega un papel importante en la respuesta celular a diferentes genotóxicos, puede ser fosforilada por ATM en el residuo Ser-15, lo cual tiene como consecuencia el incremento en la transcripción de diferentes genes involucrados en procesos como la detención en el ciclo celular, la apoptosis y la senescencia en respuesta al daño por DSB (Barzilail, 2007; Meek, 2004). Mutantes de diferentes moléculas involucradas en la estabilidad del genoma se han reportado por presentar

fenotipos de envejecimiento prematuro. En ratones, la disfunción de Atm, DNA-PKcs, KU86, p53, Wrn y XpdTTd/XPA, las cuales participan en la respuesta de reparación del ADN, causa fenotipos de envejecimiento prematuro en diferentes tejidos y órganos, sugiriendo que las moléculas involucradas en la reparación del ADN juegan un papel importante en el proceso normal de envejecimiento. En los humanos, la patología de AT incluye entre sus características un envejecimiento acelerado. La inestabilidad genómica y defectos en la reparación del ADN como producto de la deficiencia de ATM podría contribuir al fenotipo de envejecimiento prematuro ya que ATM participa en el mantenimiento de los telómeros (Hande, 2004; Pandita, 2002). Se ha observado que células que presentan AT también tienen telómeros acortados, así como un incremento en las fusiones teloméricas. Pacientes con AT pueden presentar envejecimiento prematuro como consecuencia, al menos en parte, de la disfunción telomérica.

### **8-Hidroxi-desoxoguanosina- ADN glicosilasa (OGG1)**

El daño en el ADN se ha relacionado con la etiología de diferentes enfermedades y con el envejecimiento. La reparación de bases oxidadas en todos los organismos se lleva a cabo por medio del sistema de reparación BER. El punto principal en el sistema BER es el reconocimiento de las bases oxidadas, que posteriormente serán removidas por una enzima ADN glicosilasa. Existen 2 tipos de ADN glicosilasas en los mamíferos: la OGG1 y una homóloga de la endonucleasa tipo III (NTH1), las cuales se han caracterizado por tener una función en la remoción de daños oxidativos en las bases nitrogenadas (Hazra *et al.*, 2007). Los sustratos de estas ADN glicosilasas son altamente específicos, pero principalmente reconocen aductos de purinas y pirimidinas. NTH reconoce una gran cantidad de aductos de pirimidinas, como es el caso del aducto timidina glycol, 5-hidroxidesoxicitosina, dihidrouracil y al menos otras 6 pirimidinas oxidadas. La OGG1 es la principal enzima que remueve los daños oxidantes en los residuos de guanina, entre los que destaca el aducto 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG). Se ha reportado que la capacidad de reparación del sistema BER se presenta disminuida en el envejecimiento; además, se ha observado que en organismos envejecidos disminuye la actividad de OGG1. Consecuentemente, con la disminución en la actividad del sistema BER, se ha

observado un incremento en los niveles de concentración del aducto 8-OHdG durante el envejecimiento (Chen *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha reportado que en la enfermedad de Huntington, las mutaciones somáticas asociadas a la progresión de la enfermedad tienen su origen en una acumulación del triplete CAG; a su vez, esta acumulación se debe a una incapacidad del sistema para remover los daños en las bases oxidadas (Kovtun *et al.*, 2007). La acumulación del daño oxidativo debido a la acumulación del aducto 8-OHdG es dependiente del envejecimiento y podría ser la causa del incremento de los tripletes CAG mediados por la reacción de reparación, lo que nos sugiere que la enfermedad de Huntington es dependiente de la edad.

### **MSH2**

En nuestro equipo de trabajo hemos determinado que el daño oxidante en el ADN se incrementa en el envejecimiento en un modelo murino de la cepa CD-1; estos daños oxidativos se presentan por la acumulación del aducto 8-OHdG y por la presencia de rompimientos del tipo SSB y DSB (López-Diazguerrero, 2005). Nosotros hemos demostrado que esta acumulación del daño en el ADN podría ser por una disminución en los niveles de expresión del sistema de reparación MMR, en donde la enzima MSH2 juega un papel fundamental durante la reparación del ADN. Los niveles de expresión de la enzima MSH2 se observan disminuidos en diferentes tejidos como el hígado, el corazón y el ovario de ratones envejecidos de la cepa CD-1. La disminución en la expresión de MSH2 es el resultado de una regulación epigenética, en donde nosotros observamos que el promotor de la enzima MSH2 se encuentra metilado en mayores proporciones en los individuos envejecidos en comparación con los individuos sanos (Conde-Perezprina, 2008). Finalmente, en recientes trabajos de nuestro grupo, hemos observado que existe una disminución en los niveles de expresión de la enzima MSH2 dependiente de la edad en dos diferentes tipos de murciélagos, *Desmodus rotundus* (hematófago) y *Myotis* (insectívoro); dicha disminución tiene como consecuencia un incremento en el daño al ADN evaluado por la aparición de secuencias satelitales, que es un mecanismo alternativo para evaluar el daño oxidativo al ADN.

El estrés oxidante es un factor importante en la acumulación de biomoléculas oxidadas durante el proceso de envejecimiento. Los daños que destacan en las biomoléculas son el daño al ADN, que puede presentarse en diferentes formas como la aparición de aductos, los rompimientos de SSB y DSB; así como los diferentes tipos de mutaciones. Los sistemas de reparación del ADN que, se ha observado, disminuyen durante el envejecimiento son: el BER, MMR y la enzima ATM. Es evidente que la falla en los sistemas de reparación del ADN tiene consecuencias graves en el funcionamiento bioquímico, estructural y molecular de los individuos, lo que sin duda es una de las características del proceso del envejecimiento. ¿Cómo podremos disminuir los daños oxidantes al ADN?, ¿será esta la alternativa que estamos buscando para aminorar los efectos del envejecimiento? Estas son algunas de las cuestiones que debemos de resolver para comprender el proceso del envejecimiento. Para ello es necesario que desarrollemos modelos biológicos en donde se pueda incrementar la respuesta para contrarrestar el daño oxidante al ADN, tal vez incrementando la expresión de enzimas como Ogg1, ATM o MSH2 o, quizá, tratando de disminuir los niveles de ERO o incrementando la respuesta antioxidante. Para ello podemos utilizar las herramientas moleculares con las que contamos hasta hoy. En los últimos tiempos han surgido nuevas estrategias para el estudio del envejecimiento entre las que destacan los modelos horméticos, los cuales consisten en adaptar los modelos biológicos a condiciones ligeras de estrés oxidante, con lo que se ha observado un incremento en la respuesta antioxidante que le confiere protección ante restos letales. Estos y otros modelos por investigar son los que debemos desarrollar para generar más conocimiento sobre el proceso de envejecimiento.



1. Alamuri P, Maier RJ. Methionine sulphoxide reductase is an important antioxidant enzyme in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 2004;53:1397–1406.
2. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Inv*, 1984;73:599–601.
3. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 1997;272:217–221.
4. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003;421:499–506.
5. Barzilai A. The contribution of the DNA damage response to neuronal viability. *Antioxid Redox Signal*, 2007;9:211–218.
6. Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science*, 2004;304:596–600.
7. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 1997;6:391–397.
8. Carmody RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep*, 2001;6:77–90.
9. Chen SK, Hsieh WA, Tsai MH et al. Age-associated decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging. *J Radiat Res*, 2003;44: 31–35.
10. Conde-Perezprina JC, Luna-López A, López-Diazguerrero NE, Damián-Matsumura P, Zentella A, Königsberg M. Msh2 promoter region hypermethylation as a marker of aging-related deterioration in old retired female breeder mice. *Biogerontology*, 2008;9(5):325–334
11. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1999;39:67–101.
12. Delaunay A, Isnard A, Toledano MB. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO Journal*, 2000;19:5157–5166.
13. Doke N, Scandalios JG. The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor. 1997;785–813.
14. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol*; 1956;11:298–300.
15. Gabbita SP, Robinson K, Stewart C, Floyd R, Hensley K. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000;376:1–13.
16. Ghosh JMC. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 1998;95:13182–13187.
17. Halliwell B, Gutteridge J M C. *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.) Oxford University Press, 1999.
18. Hande MP. DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res*, 2004;104:116–122.
19. Hazra TK, Das A, Das S, Choudhury S, Kow YW, Roy R. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA Repair (Amst)*, 2007;6:470–480.
20. Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N., Yanase, S, Ayusawa D, Suzuki K. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*, 1998;394:694–697.
21. Jang HH, Surh YJ. Protective effects of resveratrol on b-amyloid induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med*, 2003;34:1100–1110.
22. Kiley PJ, Storz G. Exploiting thiol modifications. *PLoS Biol*, 2004;2:1714–1717.
23. Kim HJ, So YJ, Jang JH, Lee JS, Oh YJ, Surh YJ. Differential cell death induced by salsolinol with and without copper: possible role of reactive oxygen species. *Mol Pharmacol*, 2001;60:440–449.
24. Kovtun IV, Liu Y, Bjoras M, Klungland A, Wilson SH, McMurray CT. OGG1 initiates age-dependent CAG tri-nucleotide expansion in somatic cells. *Nature*, 2007;447:447–452.
25. Lee JH, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 2005;308: 551–554.
26. Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Chen JC, Davis BH, Sim JE, Corry PM, Spitz DR. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast

- carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1998;273:5294–5299.
27. Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*, 2005;120:497–512.
  28. López-Diazguerrero, NE, Luna-López A, Gutiérrez-Ruiz MC, Zentella Dehesa A, Konigsberg Fainstein M. “Susceptibility of DNA to oxidative stressors in young and aging mice”. *Life Sci*, 2005;77:2840-2854.
  29. Martin I, Jones MA, Rhodenizer D, Zheng J, Warrick JM, Seroude L, Grotewiel M. Sod2 knockdown in the musculature has whole organism consequences in *Drosophila*. *Free Radic Biol Med*, 2009;47:803–813.
  30. Meek DW. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, 2004;3:1049–1056.
  31. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med*, 1990;8:95–108.
  32. Moradas-Ferreira P, Costa V. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defenses, damage and death. *Redox Report*, 2000;5:277-285.
  33. Pandita TK. ATM function and telomere stability. *Oncogene*, 2002;21:611–618.
  34. Paulovich AG, Toczysky DP, Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell*, 1997;88:315-321.
  35. Ruis H, Schuller C. Stress signaling in yeast. *BioEssays*, 1995;17:959-965.
  36. Scandalios JG. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Plainview NY U.S.A. 1997.
  37. Scandalios JG. Genomic responses to oxidative stress. In: Meyers RA (Editor), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, 2004; Vol. 5. 2nd edn. Wiley-VCH Weinheim Germany. 489-512.
  38. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen, H, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 2005;308:1909–1911.
  39. Shiloh Y, Kastan MB. ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res*, 2001;83:209–254.
  40. Storz G, Imlay JA. Oxidative stress. *Current Opin Microbiol*, 1999;2:188-194.
  41. Sun J, Tower J. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol Cell Biol*, 1999;19:216–228.
  42. Tohyama YTT, Yamamura HB. Cell responses to oxidative stress. *Curr Pharma Design*, 2004;10:835–839.

### **Armando Luna López**

Licenciado, maestro y doctor en Biología Experimental por la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Ganador de la medalla al mérito universitario otorgada por la Universidad Autónoma Metropolitana. Estancia en el Medical College of Georgia. Publicaciones: cinco internacionales indexadas y una nacional de divulgación. Participación en congresos: 30 nacionales y 10 internacionales. Cursos de actualización en cromatografía de líquidos de alta resolución, PCR en tiempo real, entrenamiento y reentrenamiento en protección radiológica. Impartición de cursos de licenciatura y posgrado en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Dirección de dos tesis de licenciatura y de dos servicios sociales. Asesor de un alumno de posgrado. Áreas de investigación: participación de Bcl-2 en la supervivencia celular en respuesta al estrés oxidante; respuesta celular antioxidante; la participación de la proteostasis en el envejecimiento; estrés oxidativo y fragilidad en adultos mayores; la hormesis en el envejecimiento.

**Viviana Pérez I.**

Departamento de Biología Celular y Estructural  
e Instituto Barshop de Envejecimiento y  
Longevidad. Centro de Ciencias de la Salud de la  
Universidad de Texas en San Antonio, Estados  
Unidos.

perezv3@uthscsa.edu

**Mina Konigsberg**

Departamento de Ciencias de la Salud,  
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.  
mkf@xanum.uam.mx

as proteínas son las biomoléculas más abundantes dentro de las células y están encargadas de una gran parte de las vías metabólicas requeridas para la vida de los organismos. De ahí que las alteraciones que sufren estas moléculas durante su vida media dentro de las células sean un evento que ha tomado una gran relevancia cuando se trata de entender el fenómeno del envejecimiento. Anteriormente se pensaba que los daños importantes sólo ocurrían en el ADN, pero ahora se sabe que el mal plegamiento de las proteínas, su oxidación así como su agregación, y la ineficiencia de la célula para desecharlas son factores fundamentales no sólo para inducir el deterioro asociado al envejecimiento, sino que se les ha relacionado con una gran cantidad de enfermedades degenerativas.

Inicialmente, los estudios del daño que provocan las especies reactivas de oxígeno (Lopez-Diazguerrero *et al.*, 2005) sobre las macromoléculas se abocaban principalmente al análisis del daño al ADN, puesto que esta molécula es la que se transmite a la siguiente generación celular. Así, efectivamente, se encontró que el ADN de organismos viejos tiene más daño que el de jóvenes (Bohr *et al.*, 1998; López-Diazguerrero *et al.*, 2005); sin embargo, a la fecha ha sido difícil correlacionar de manera directa la mutación de ciertos genes particulares con el envejecimiento para encontrar el gen del envejecimiento o el de la longevidad (Olshansky *et al.*, 1990).

Ahora bien, recientemente se ha encontrado una acumulación de proteínas oxidadas o dañadas durante el envejecimiento, así como en varias enfermedades neurodegenerativas asociadas a la vejez. Estos depósitos de componentes alterados causan un deterioro en las células y disminuyen su funcionalidad, por lo que se ha empezado a estudiar el papel que juega la acumulación de proteínas durante el envejecimiento (Reshma y Kelvin, 2002; Gidalevitz *et al.*, 2010).

Recientemente ha surgido un concepto conocido como proteostasis u homeostasis proteica en eucariotes, que se refiere al control de la concentración proteica dentro de las células, al buen plegamiento o estructura

tridimensional y a las correctas interacciones entre las proteínas que componen el proteoma (Balch *et al.*, 2008). Se ha propuesto que la proteostasis permite un desarrollo celular exitoso y protege a los organismos de las enfermedades y la carencia de estos sistemas se ha relacionado con enfermedades lisosomales o enfermedades conformacionales, así como con el establecimiento del envejecimiento (Powers *et al.*, 2009).

### Proteostasis

La proteostasis puede entenderse como la correcta participación de varios sistemas que, en conjunto, mantienen el equilibrio entre las proteínas que se sintetizan, se pliegan y son estructural y bioquímicamente funcionales, con la degradación y el desecho de las proteínas dañadas o inservibles; todo esto asociado a las diversas vías de señalización, como son la respuesta a estrés oxidativo y la progresión del ciclo celular, entre otros. Es por ello que en los últimos años se ha empezado a hablar de los sistemas que integran a la proteostasis como una red, conocida en inglés como *proteostasis network* (PN) o red proteostática (RP) (Roth y Balch, 2010). Los tres componentes fundamentales propuestos para la RP son (figura 1):

- 1) El sistema de síntesis de proteínas, desde su traducción en los ribosomas hasta sus modificaciones postraduccionales.
- 2) El sistema de plegamiento de proteínas, que incluye chaperonas y cochaperonas de la familia de las Hsc/Hsp 70 y 90, entre otras.
- 3) El sistema de degradación de proteínas, formado por el proteosoma, la autofagia y toda la degradación proteica vía lisosoma.

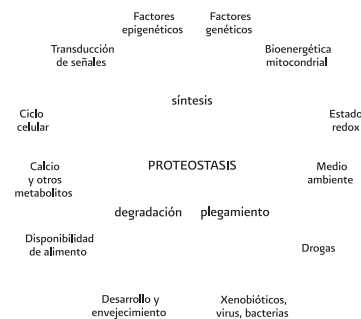


Figura 1. Componentes de la red proteostática.

Los componentes fundamentales de la RP serán diferentes dependiendo del tipo celular del que se trate y del estado fisiológico en el que se encuentre. Es importante pensar en la RP como un ente dinámico que puede variar y que se ve modificado por los cambios en la composición iónica y de metabolitos celulares, por el metabolismo bioenergético, por la distinta información genética y epigenética, por cambios en el estado redox, por factores del medio ambiente, entre otros. De manera que la RP será diferente durante las diversas etapas del desarrollo de un organismo y, por tanto, también durante el envejecimiento.

La capacidad de la RP para mantener el balance del proteoma en el citosol, la entrada y salida de proteínas a la célula y el tráfico entre los compartimientos celulares, debe ser una regulación muy sutil que mantiene el equilibrio entre sintetizar, plegar y mantener activa una proteína, o bien, marcarla para su degradación. Este equilibrio de los tres componentes de la RP se conoce como control general de la proteostasis y tiene un amplio componente termodinámico. Los dos procesos ensambladores, como son la síntesis de proteínas y el plegamiento de las mismas, son procesos con un alto costo energético, es decir, son procesos no espontáneos, con un  $\Delta G$  negativo y, por tanto, dependientes de ATP.

En cuanto al tercer sistema, podría pensarse que, puesto que involucra procesos degradativos, sería energéticamente favorable y espontáneo. Sin embargo, ahora se sabe que la autofagia y la degradación de proteínas vía el proteosoma y el lisosoma son procesos altamente regulados y dependientes de ATP (Luce *et al.*, 2010). Esto es muy importante, ya que se ha reportado que durante el envejecimiento hay un decremento en la función mitocondrial y en la obtención de energía, lo cual indica no sólo que la síntesis de las proteínas y su correcto plegamiento disminuyen durante el envejecimiento, sino que también la eliminación de proteínas disfuncionales está alterada.

### **Oxidación de proteínas**

La oxidación de proteínas es uno de los eventos asociados tanto con la pérdida de la proteostasis como con el proceso del envejecimiento más estudiados. Desde hace varios años se ha reportado que existe una acumulación de proteínas oxidadas en células y tejidos de animales y pacientes de edad avanzada (Grune *et al.*, 2005; Dunlop

*et al.*, 2009), así como durante varias enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington (Dillin y Cohen, 2011).

En los capítulos anteriores se describieron algunos de los eventos relacionados con la producción de ERO/ERN, los cuales, se sabe, son capaces de promover la oxidación de proteínas. Sin embargo, también hay que tomar en cuenta otros factores que pudieran estar modificados durante el envejecimiento, favoreciendo un estado prooxidante dentro de las células. Estos factores pueden ser la disponibilidad de metales libres, en particular hierro y cobre, los cuales a su vez están determinados por la concentración de metaloproteínas (ferritina, transferrina, lactoferrina y ceruloplasmina); así como la concentración de vitaminas (A, C y E) y metabolitos (ácido úrico, albúmina, bilirrubina), que también se ha reportado disminuyen con la edad, y los quelantes de iones metálicos (Piña y Zentella, 2008).

Ahora bien, cuando los radicales libres reaccionan con las proteínas, lo hacen principalmente sobre los grupos funcionales de los aminoácidos, generando una pérdida de su función. En particular, los daños se producen en los aminoácidos que contienen azufre: metionina y cisteína. En el caso de la metionina, se genera el sulfóxido de metionina y en el de la cisteína se generan puentes disulfuro, tanto intra como intermoleculares, que además de cambiar la conformación tridimensional de las proteínas, promueven su agregación, minando su funcionalidad. Las modificaciones de este tipo pueden revertirse por la acción de enzimas como la metionina-sulfoxidoreductasa, o bien, las isomerasas de proteína-sulfuros (Shringarpure y Davies, 2002). Otro desenlace durante la oxidación de las cisteínas es la oxidación de los grupos sulfhidrilos, que las convierte en ácido sulfénico (R-SOH), reacción que todavía es reversible, y en ácido sulfinico (R-SO<sub>2</sub>H) y ácido sulfónico (R-SO<sub>3</sub>H), en el primer caso es reversible por acción de la sulfiredoxian, mientras que en el segundo ya no lo es (Thomas y Mallis 2001; Eaton, 2006). Es importante mencionar que los grupos tioles en las cisteínas se encuentran altamente protegidos y, para prevenir su oxidación, la célula trata de mantener un estado redox relativamente reducido mediante el sistema del glutatión (GSH), los sistemas de las tioredoxinas I y II, y la glutaredoxina (Pérez *et al.*, 2009). En los humanos,

se sabe que el estado redox del plasma se modifica con la edad, incrementando la vulnerabilidad de los grupos tioles y, por lo tanto, promoviendo el daño oxidativo (Pandey *et al.*, 2010).

Los radicales libres también pueden oxidar aminoácidos aromáticos y producir derivados hidroxilados, o bien, reaccionar con otros aminoácidos, como lisina, arginina, prolina o treonina, generando derivados carbonilados (Davies, 2005). De todas estas modificaciones, sólo las de los aminoácidos con azufre pueden revertirse de manera enzimática, exceptuando aquellas que se han superoxidado en especies sulfónicas que, junto con el resto, deben ser eliminadas de manera selectiva para prevenir la acumulación de proteínas no funcionales y dañadas (Reshma y Kelvin, 2002; Zentella y Piña, 2008) como se discutirá más adelante.

### **Agregados proteicos**

El estrés crónico y la oxidación continua de las proteínas pueden llevar al desdoblamiento o mal plegamiento de las proteínas, así como a la formación de oligómeros tóxicos de proteínas o agregados que contribuyen al establecimiento de las enfermedades antes señaladas.

Algunos de estos agregados se conocen como lipofuscina. La lipofuscina tradicionalmente se ha asociado a los lisosomas, puesto que es en ese organelo en donde se acumulan las proteínas o péptidos que no pudieron ser degradados por esta vía. La lipofuscina es, al parecer, la responsable de la autofluorescencia que se observa en las células de organismos viejos (Szweda *et al.*, 2003; Powell *et al.*, 2005). Ahora se sabe que las proteínas carboniladas que escapan de la degradación vía el proteosoma y la maquinaria de degradación mitocondrial (Lon proteasas) (Luce *et al.*, 2010), se acumulan en el citosol con el paso del tiempo, formando agregados proteicos insolubles con un alto peso molecular.

En estudios que comparan la estabilidad proteica y la resistencia al estrés oxidante en especies longevas de mamíferos como los ratopines rasurados (*Heterocephalus glaber* o *naked mole-rat* en inglés), que viven hasta 30 años, contra especies poco longevas, como los ratones (*Mus musculus*) que viven máximo cuatro años, se encontró una menor oxidación de cisteínas, así como menores niveles de ubiquitinación en la especie más longeva (Pérez *et al.*, 2009; Bhattacharya *et al.*, 2011); este hallazgo

sugiere que la correcta eliminación de proteínas dañadas es un factor clave para un envejecimiento exitoso.

### **Retículo endoplásmico y plegamiento de proteínas**

Aunado a los reportes sobre el deterioro en los sistemas degradadores de proteínas, existe otra serie de artículos que proponen que durante el envejecimiento se observan perturbaciones en el correcto plegamiento y ensamblaje de las mismas. Este proceso se lleva a cabo en el retículo endoplásmico (RE) en el cual se encuentran, en un ambiente oxidado, una gran cantidad de proteínas chaperonas, lectinas y enzimas procesadoras de carbohidratos encargadas de ayudar al plegamiento exitoso de las proteínas (Marciniak y Ron, 2006). Las perturbaciones en la homeostasis del RE, que pueden estar dadas por disminución en la disponibilidad de energía, alteraciones en las concentraciones de calcio, isquemia y otros, dan lugar a una respuesta protectora en la célula conocida como UPR (*unfolded protein response*), que culmina con la muerte celular por apoptosis (Kapoor y Sanyal, 2009). Se ha visto que durante el envejecimiento hay una disminución en la respuesta de las chaperonas y se incrementan las proteínas mal plegadas (Naidoo, 2009a; Naidoo, 2009b). En el caso de las proteínas de choque térmico, también llamadas *heat shock proteins* (HSP) y de las que se hablará más adelante, no sólo participan en el plegamiento dentro del RE, sino durante diversas respuestas a estrés, en particular las Hsp70 y Hsp90, que también participan en los procesos de autofagia y degradación proteica antes mencionados (Calderwood *et al.*, 2009; Rodgers *et al.*, 2009). Se ha reportado que en diversos organismos como *Drosophila* y *C. elegans*, hay una disminución transcripcional de esta familia de proteínas durante el envejecimiento (Hsu *et al.*, 2003). En humanos, el estrés en el RE, el mal plegamiento y la carencia de chaperonas activas se han visto implicados en el desarrollo de enfermedades como la diabetes (Fonseca *et al.*, 2009), aterosclerosis (Zhao y Ackerman, 2006) y enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad como el Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (Calderwood *et al.*, 2009) y el Parkinson (Yoshida, 2007). A este fenómeno se le conoce de manera general como enfermedades conformacionales ya que, aunque son diferentes patologías, con distintas manifestaciones clínicas en las que participan diversas proteínas, se ha sugerido que se originan por tener alterado el mecanismo para la eliminación de las proteínas alteradas.

### Degradación de proteínas a través del proteosoma

Aunque se conocen varios procesos biológicos que están involucrados en el mantenimiento de la proteostasis, los sistemas más estudiados que se relacionan con la degradación de las proteínas durante el envejecimiento y enfermedades relacionadas, como se mencionó antes, son: el sistema lisosomal (autofagia) y el proteosoma, así como el sistema de plegamiento proteico que incluye a las chaperonas y las proteínas de choque térmico (HSP o *heat shock proteins*, por sus siglas en inglés).

El proteosoma juega un papel importante de manera particular en la degradación de proteínas de vida corta, que presentan algún deterioro como proteínas anormales, mal plegadas u oxidadas, las cuales tienden a acumularse con la edad (Coux *et al.*, 1996). Se ha observado una disminución de la función del proteosoma durante el envejecimiento y la senescencia celular.

La estructura más común del proteosoma es la 26S, la cual está directamente relacionada con la degradación de proteínas vía el sistema de ubiquitina. El proteosoma 26S está compuesto de una subunidad 20S, la subunidad catalítica encargada de la degradación proteica. Además posee dos subunidades reguladoras de 19S con actividad de ATPasa, las cuales permiten la entrada de las proteínas dañadas que ya han sido ubiquitinadas hacia adentro del proteosoma. También tiene una subunidad 11S que es similar a la 19S, pero participa en la degradación de péptidos ajenos, es decir, no pertenecientes al organismo, como aquellos generados después de una infección viral. A su vez, la subunidad catalítica 20S está constituida generalmente por cuatro anillos, cada uno compuesto de siete subunidades: dos anillos externos formados por subunidades alfas ( $\alpha 1-7$ ) y dos anillos centrales conteniendo subunidades  $\beta$  ( $\beta 1-7$ ). Todas estas subunidades en conjunto son responsables de las diferentes actividades del proteosoma: actividad hidrolítica (péptido peptidilglutamil, PGPH), básica (actividad tipo tripsina, T-L) y actividad hidrofóbica (actividad tipo quimiotripsina, CT-L) (Voges *et al.*, 1999).

En general, la pérdida en la actividad del proteosoma ha sido asociada con la edad en diversos tejidos tanto en humanos como en roedores, por ejemplo: músculo (Husom *et al.*, 2004; Ferrington *et al.*, 2005), piel (Bulteau *et al.*, 2000; Chondrogianni *et al.*, 2000), hígado (Shibatani *et*

*al.*, 1996), corazón (Bulteau *et al.*, 2002), entre otros. Resulta interesante que no todas las subunidades del proteosoma son afectadas por el envejecimiento, sino más bien se ha observado que la disminución en la función del proteosoma se debe a la pérdida de la expresión de las subunidades del tipo  $\beta$  (Lee *et al.*, 2002; Chondrogianni *et al.*, 2003). Además, también se ha descrito que existe un aumento en el daño de las subunidades del proteosoma asociado a la edad, por ejemplo: modificaciones por oxidación, ubiquitinación, glicación, peroxidación lipídica y otros (Bulteau *et al.*, 2000; Keller *et al.*, 2000; Carrard *et al.*, 2002). En el año 2003, los experimentos de Chondrogianni y colaboradores fortalecieron la idea del papel que juega el proteosoma durante el envejecimiento, ya que ellos observaron que al inhibir la actividad específica del proteosoma en células jóvenes, se inducía el fenotipo senescente después de dos semanas de tratamiento; demostrando así que la acumulación de proteínas dañadas e inhibición del proteosoma son factores importantes durante la senescencia.

### Degradación de proteínas a través de la autofagia

El sistema de autofagia, que viene de un término griego que significa “comerse a uno mismo”, puede degradar y reciclar proteínas de vida larga (que constituyen más de 90% del total de las proteínas celulares), agregados macromoleculares, membranas biológicas y organelos intracelulares que han sufrido daño, incluyendo mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico, peroxisomas y otros. Por lo tanto, a diferencia del proteosoma, la autofagia no solamente degrada proteínas, también elimina diversos organelos o estructuras que ya no son requeridos por la célula, ya sea por que están dañadas o porque son redundantes, de ahí su importancia en mantener la proteostasis. Numerosas evidencias sugieren que una disminuida actividad en la autofagia juega un papel fundamental en el proceso del envejecimiento y en patologías asociadas a él, incluyendo los desórdenes neurodegenerativos (Cuervo, 2008).

En general, la autofagia funciona como un mecanismo de defensa contra infecciones, ya que muchos de los agentes infecciosos como bacterias, parásitos, virus y otros pueden ser eliminados vía autofagia antes de que logren establecer la infección (Dorn *et al.*, 2002; Talloczy *et al.*, 2002). Es así como estudios inmunológicos han establecido recientemente que la autofagia es importante

durante el proceso de presentación de antígenos y defensa celular, lo cual sugiere que la disminución de la actividad autofágica con la edad podría aumentar el riesgo de contraer enfermedades infecciosas en los organismos viejos. Por otro lado, la autofagia también ha sido clasificada como un mecanismo de protección celular, ya que la eliminación de agregados proteicos y organelos dañados evitaría que la célula adquiriera un daño mayor; es por ello que un aumento de la capacidad autofagocítica tendría un potencial efecto terapéutico. Además, como es bien sabido, la restricción calórica e inhibición de la vía mTOR (mediante el uso del compuesto rapamicina) son los dos únicos tratamientos no genéticos que aumentan la supervivencia en diversos organismos y se cree que, en parte, su efecto sería a través de un aumento en la actividad autofágica (Levine, 2010).

Por otro lado, la actividad lisosomal, que es una parte importante en el proceso de autofagia, también disminuye con el envejecimiento (Martínez-Vicente *et al.*, 2005). Estas alteraciones en los lisosomas son claramente observadas a través de la acumulación de estructuras pigmentosas autofluorescentes llamadas lipofuscina, que se acumulan en vesículas lisosomales como resultado de una digestión incompleta (Terman *et al.*, 1999; Terman, 2002), como se mencionó al inicio de este capítulo.

La baja actividad del lisosoma observada con la edad ha sido atribuida a una disminución de los niveles del receptor LAMP-2A (una proteína transmembranal que participa en la fusión de las membranas lisosomal y endosomal durante la fase tardía de maduración del autofagosoma) (Terman *et al.*, 2007). Se ha observado que la acumulación de lipofuscina en células posmitóticas de animales de vida corta es muy rápida; en cambio, en células posmitóticas de animales de vida larga, ésta es muy lenta (Nakano *et al.*, 1995), lo que resulta interesante.

### **Autofagia y patologías asociadas al envejecimiento**

Diversas enfermedades humanas están asociadas a una disminución de la actividad autofágica, especialmente en células que no se dividen, como en el sistema neuronal y muscular, en las cuales el recambio proteico es crítico. Por ejemplo, los desórdenes musculares conocidos como miopatías se han asociado a una acumulación de vacuolas lisosomales o autofágicas que son imperfectas. Entre estas enfermedades se encuentran la enfermedad

de Danon, que se caracteriza por cardiomiopatía y retardo mental leve, y es causada por una deficiencia en el receptor LAMP-2a (Nishino *et al.*, 2000), miopatías ligadas al cromosoma X y el síndrome de Marinesco-Sjögren (Goto *et al.*, 1990). Además, la alteración en el sistema de autofagia también se ha relacionado con las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, tales como la enfermedad de Parkinson (PD) (Anglade *et al.*, 1997), Alzheimer (AD) (Cataldo *et al.*, 1996) y Huntington (HD) (Kegel *et al.*, 2000). Todas ellas se caracterizan por una actividad alterada de los sistemas proteolíticos y la ocurrencia de agregados proteicos (o cuerpos de inclusión).

La reducida actividad autofágica también ha sido relacionada con enfermedades hepáticas crónicas y carcinoma hepatocelular debido a la acumulación de proteínas mutantes alfa (1)-anti-tripsina Z (ATZ) en el retículo endoplásmico y las mitocondrias (Teckman *et al.*, 2004). Por lo tanto, las alteraciones en cualquier estado de la formación de la vacuola autofágica podrían resultar en la acumulación de estos agregados proteicos y permitir la progresión de una patología.

### **Respuesta de choque térmico y chaperonas**

Casi toda célula de tipo procariota o eucariota está expuesta a cambios en la temperatura ambiental, lo cual lleva a la producción de proteínas de respuesta a temperatura (HSP) mencionadas anteriormente (Lindquist y Craig, 1988). Las HSPs son bastante conservadas evolutivamente y poseen un papel fundamental en el mantenimiento de la proteostasis, ya que poseen una función de chaperonas, las cuales se encargan de mantener la estructura terciaria de las proteínas, utilizando la hidrólisis de ATP como suministro de energía (Ellis, 2007).

Estudios recientes han demostrado que la respuesta al estrés de temperatura (*heat shock response*, HSR) disminuye con la edad, especialmente en el tejido neuronal (Sherman *et al.*, 2001; Winklhofer *et al.*, 2008; Hands *et al.*, 2008), músculo esquelético, músculo cardiaco (Kayani *et al.*, 2008) e hígado (Gagliano *et al.*, 2007).

De esta manera, se ha observado que las células pierden la capacidad de activar la vía transcripcional que da paso a la síntesis de las HSPs, disminuyendo el control de calidad de las proteínas y, por ende, la probabilidad de que las



proteínas formen agregados proteicos aumenta, siendo acompañado por patologías como Alzheimer, Parkinson y Huntington; todas ellas, como ya se mencionó, están ligadas a la acumulación de agregados proteicos de  $\beta$ -amiloide y proteína tau, proteína sinucleína- $\alpha$  y de agregados de poliglutaminas, respectivamente (Hands *et al.*, 2008; Winklhofer *et al.*, 2008). Actualmente, aún no es claro por qué el sistema nervioso es más propenso que otros a generar agregados proteicos, pero es sabido que la HSR es bastante débil en este tejido. Además, se ha observado que el músculo esquelético también sufre una disminución del HSR con la edad, en la cual existe una correlación directa entre pérdida de la masa muscular, generación de fuerza y expresión de HSPs, sugiriendo que la pérdida de una mayor cantidad de músculo esquelético está relacionada con disminución de la expresión de las chaperonas. Lo anterior fue comprobado, en parte, por estudios realizados en ratones, en los que la sobreexpresión de la proteína *heat shock* 70 (Hsp70) revirtió una parte de los efectos asociados al envejecimiento en el músculo (Kayani *et al.*, 2008).

### Chaperonas y plegamiento de proteínas

La estructura de la proteína está siempre en un estado dinámico de plegamiento y desplegamiento; cuando esto último ocurre, las proteínas exponen regiones hidrofóbicas,

que las hacen propensas a formar agregados. Durante este proceso, las chaperonas cubren dichas regiones hidrofóbicas para asegurar que la proteína adquiera una estructura y conformación estable y no forme oligómeros o agregados. Este tipo de chaperonas son esenciales durante el envejecimiento, debido a que dicho sistema se encarga de reparar las proteínas dañadas, las cuales, si no son reparadas, forman los agregados proteicos que ya se han mencionado.

La familia de chaperonas incluye a las proteínas: Hsp10, Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 y Hsp110. Las Hsp10 y Hsp60 son denominadas chaperoninas, debido a que se oligomerizan hasta formar grandes estructuras que envuelven a la proteína, funcionando como reales cámaras de plegamiento (Calderwood *et al.*, 2007). Las Hsp70 y Hsp90 se unen a las secuencias mal plegadas e hidrofóbicas de las proteínas citoplásmicas, las cuales también forman grandes complejos que involucran a una familia de proteínas accesorias o cochaperonas que se unen a la chaperona principal para facilitar la unión, la actividad hidrolítica del ATP y la desunión de la respectiva chaperona de la proteína (Mayer y Bukau, 2005). También existe una familia de HSPs pequeñas que participan en el proceso de plegamiento, tal como la Hsp27; estas chaperonas pequeñas forman complejos

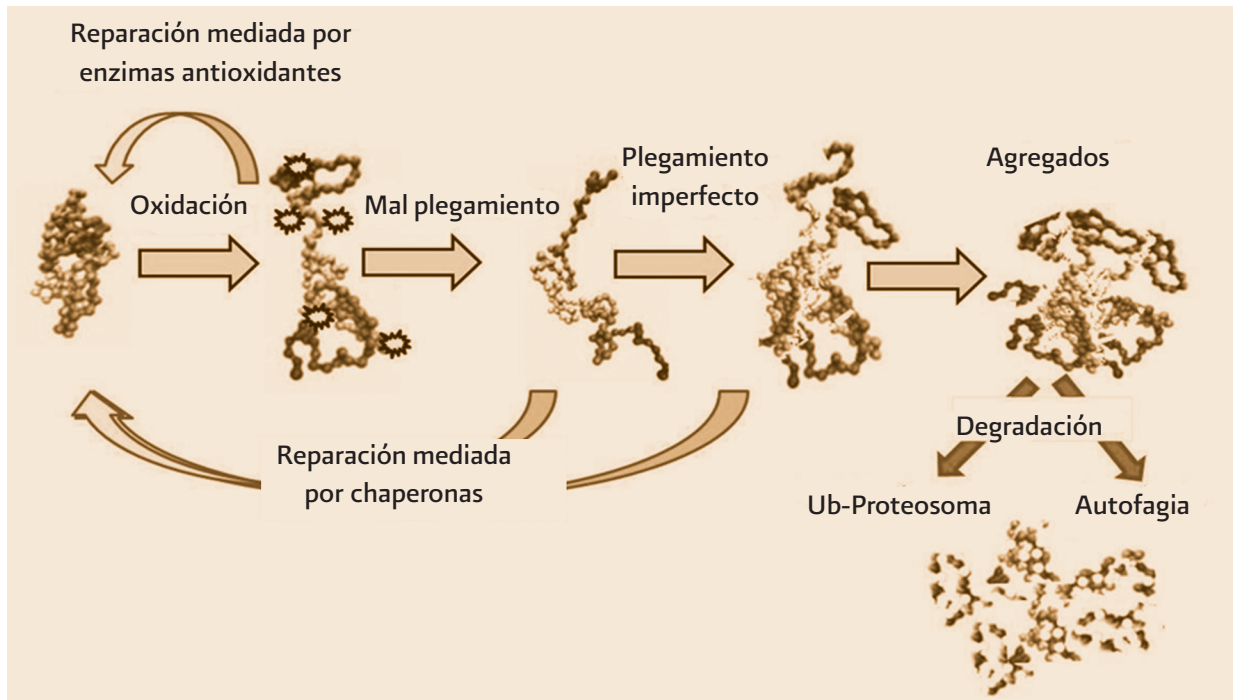


Figura 2. Mecanismos celulares involucrados en la proteostasis.

de alto peso molecular (conteniendo un gran número de chaperonas pequeñas) que mantienen y pliegan a la proteína de manera independiente de ATP, de este modo, un proceso de plegamiento eficiente involucra una respuesta coordinada de todos los tipos de chaperonas.

Es importante mencionar que para un buen control de calidad mediado por chaperonas, se necesita que éstas se unan a un extremo carboxilo terminal llamado dominio de repetición tetratricopéptido (TPR, por sus siglas en inglés) que se encuentra en proteínas de anclajes llamadas "Hop", las cuales poseen al menos dos dominios TPR, y que puede unir simultáneamente a ambas Hsp70 y Hsp90, permitiendo así un proceso coordinado de estabilización y de plegamiento eficiente (D'Andrea y Regan, 2003; Mayer *et al.*, 2005). En su conjunto, el mecanismo por el cual las chaperonas actúan puede llegar a ser mucho más complejo a lo previamente descrito; por ejemplo, se ha visto que, además de chaperonas, participan proteínas cinasas y otras proteasas, lo cual en su conjunto asegura un buen funcionamiento de este proceso. Por otro lado, cabe mencionar que la expresión de dichas chaperonas es altamente regulada por factores de respuesta a calor (del inglés *Heat Shock Factor*, HSFs), que son factores de transcripción que se unen a la región promotora de las chaperonas aumentando los niveles de expresión. El principal representante de estos HSF es el HSF-1, cuya importancia se evidenció cuando, al sobreexpresar este gen en *C. elegans*, se logró aumentar la longevidad de este modelo animal disminuyendo, además, los agregados de poliglutaminas o polyQ. Lo anterior sugiere que el sistema de HSF, en conjunto con las chaperonas, juega un papel importante en la proteostasis.

Lo que se ha discutido en este capítulo sugiere que durante el envejecimiento existe una pérdida del mecanismo de control de calidad de las proteínas, facilitando su agregación y la formación de cuerpos de inclusión que son típicos en enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad. Por ello es de esperarse que en un futuro cercano veamos una gran cantidad de estudios enfocados a entender el mecanismo por el cual se dañan y se acumulan las proteínas con la edad, así como intervenciones terapéuticas tratando de aumentar los niveles de chaperonas, así como la eficiencia de los sistemas degradadores.

1. Adams VJ, Evans KM, Sampson J, Wood JL. Methods 1. Anglade PS, Vyas F, Javoy-Agid MT, Herrero PP, Michel J, Marquez A, Mouatt-Prigent M, Ruberg EC, Hirsch Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol*, 1997;12:25-31.
2. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*, 2008;319:916-919.
3. Bhattacharya A, Leonard S, Tardif S, Bufferstein R, Fischer KE, Richardson A, Austad SN, Chaudhuri AR. Attenuation of liver insoluble protein carbonyls: indicator of a longevity determinant?. *Aging Cell*, 2011, en prensa.
4. Bohr V, Anson RM, Mazur S, Dianov G. Oxidative DNA damage processing and changes with aging. *Toxicol Lett*, 1998;102:47-52.
5. Brunk U, Terman TA. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*, 2002;33:611-619.
6. Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B. Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp Gerontol*, 2000;35:767-777.
7. Bulteau AL, Szweda LI, Friguet B. Age-dependent declines in proteasome activity in the heart. *Arch Biochem Biophys*, 2002;397:298-304.
8. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Theriault JR. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett*, 2007;581:3689-3694.
9. Calderwood SK, Murshid A, Prince T. The shock of aging: Molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging. *Gerontology*, 2009;55:550-558.
10. Carrard G, Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B. Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002;34:1461-1474.
11. Cataldo AM, Hamilton DJ, Barnett JL, Paskevich PA, Nixon RA. Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 1996;16:186-199.
12. Chondrogianni N, Stratford FL, Trougakos IP, Friguet B, Rivett AJ, Gonos ES. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts:

- induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J Biol Chem*, 2003;278:28026-28037.
13. Chondrogianni NI, Petropoulos C, Franceschi B, Friguet ES, Gonos A. Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. *Exp Gerontol*, 2000;35:721-728
  14. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*, 1996;65:801-847.
  15. Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet*, 2008;24:604-612.
  16. D'Andrea L, Regan DL. TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci*, 2003;28:655-662.
  17. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*, 2005;1703:93-109.
  18. Dillin A, Cohen E. Ageing and protein aggregation-mediated disorders: from invertebrates to mammals. *Phil Trans R Soc B*, 2011;366:94-98.
  19. Dorn BR, Dunn WA, Progulsk-Fox A. Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol*, 2002;4:1-10.
  20. Dunlop RA, Brunk UT, Kenneth JR. Oxidized proteins: Mechanisms of removal and consequences of accumulation. *IUBMB Life*, 2009;61:522-527.
  21. Eaton P. Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radical Biol Med*, 2006;40:1889-1899.
  22. Ellis RJ. Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones. *Adv Exp Med Biol*, 2007;594:1-13.
  23. Ferrington DA, Husom AD, Thompson LV. Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *Faseb J*, 2005;19:644-646.
  24. Fonseca SG, Lipson KL, Urano F. Endoplasmic reticulum stress signaling in pancreatic beta-cells. *Ageing Res Rev*, 2009;8:150-159.
  25. Gagliano NF, Grizzi F, Annoni G. Mechanisms of aging and liver functions. *Dig Dis*, 2007;25:118-123.
  26. Gidalevitz T, Kikis EA, Morimoto RI. A cellular perspective on conformational disease: the role of genetic background and proteostasis networks. *Curr Opin Struct Biol*, 2010;20:23-32.
  27. Goto Y, Komiyama A, Tanabe Y, Katafuchi Y, Ohtaki E, Nonaka I. Myopathy in Marinesco-Sjogren syndrome: an ultrastructural study. *Acta Neuropathol*, 1990;80:123-128.
  28. Grune T, Merker K, Jung T, Sitte N, Davies KJA. Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence. *Free Radic Biol Med*, 2005;39:1208-1215.
  29. Hands S, Sinadinos C, Wytenbach A. Polyglutamine gene function and dysfunction in the ageing brain. *Biochim Biophys Acta*, 2008;1779:507-521.
  30. Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat shock factor. *Science*, 2003;300:1142-1145.
  31. Husom AD, Peters EA, Kolling EA, Fugere NA, Thompson LV, Ferrington DA. Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Arch Biochem Biophys*, 2004;421:67-76.
  32. Jia K, Levine B. Autophagy and longevity: lessons from *C. elegans*. *Adv Exp Med Biol*, 2010;694:47-60.
  33. Kapoor A, Sanyal AJ. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Clin Liver Dis*, 2009;13:581-590.
  34. Kayani AC, Morton JP, McArdle A. The exercise-induced stress response in skeletal muscle: failure during aging. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2008;33:1033-1041.
  35. Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castano JG, Aronin N, DiFiglia M. Huntington expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci*, 2000;20:7268-7278.
  36. Keller JN, Huang FF, Markesbery WR. Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord. *Neuroscience*, 2000;98:149-156.
  37. Lee CK, Allison DB, Brand J, Weindruch R, Prolla TA. Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99:14988-14993.
  38. Levine R, Berlett B, Moskowitz J, Mosoni L, Stadtman E. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing Dev*, 1999;107:323-332.
  39. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 1988;22:631-77.
  40. Lopez-Diazguerrero NE, Lopez-Araiza H, Conde-Perezprina JC, Bucio L, Cardenas-Aguayo MC, Ventura JL, Covarrubias L, Gutierrez-Ruiz MC, Zentella A, Konigsberg M. Bcl-2 protects against oxidative stress

- while inducing premature senescence. *Free Radic Biol Med*, 2006;40:1161-1169.
41. López-Diazguerrero NE, Luna-López A, Gutiérrez-Ruiz MC, Zentella A, Konigsberg M. Susceptibility of DNA to oxidative stressors in young and aging mice. *Life Sci*, 2005;77:2840-2854.
  42. Luce K, Weial AC, Osiewacz HD. Mitochondrial Protein quality control systems in aging and disease. En: Tavernakis N (ed.). *Protein metabolism and homeostasis in aging*. Ed. Landes Bioscience and Springer Science, 2010:108-125.
  43. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev*, 2006;86:1133-1149.
  44. Martínez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM. Protein degradation and aging. *Exp Gerontol*, 2005;40:622-633.
  45. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 2005;62:670-684.
  46. Naidoo N. ER and aging—Protein folding and the ER stress response. *Ageing Res Rev*, 2009;8:150-159.
  47. Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response and aging. *Rev Neurosci*, 2009;2:23-37.
  48. Nakano M, Oenzil F, Mizuno T, Gotoh S. Age-related changes in the lipofuscin accumulation of brain and heart. *Gerontology*, 1995;41:69-79.
  49. Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimajo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh S, Koga Y, Sue CM, Yamamoto A, Murakami N, Shanske S, Byrne E, Bonilla E, Nonaka I, DiMauro S, Hirano M. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature*, 2000;406:906-910.
  50. Olshansky SJ, Carnes BA, Cassel C. In search of Methuselah: Estimating the upper limits to human longevity. *Science*, 1990;250:634-640.
  51. Pandey KB, Mehdi MM, Maurya PK, Rizvi SI. Plasma protein oxidation and its correlation with antioxidant potential during human aging. *Dis Markers*, 2010;29:31-36.
  52. Pérez VI, Buffenstein R, Masamsetti V, Leonard S, Salmon AB, Mele J, Andziak B, Yang T, Edrey Y, Friguet B, Ward W, Richardson A, Chaudhuri A. Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2009;106:3059-3064.
  53. Piña E, Zentella M. Daño a proteínas. En: Konigsberg M (ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. México: El Manual Moderno. 2008:97-118.
  54. Powell SR, Wanga P, Divalda A, Teichberg S, Haridasc V, McCloskeyc TW, Davies KJA, Katzeff D. Aggregates of oxidized proteins (lipofuscin) induce apoptosis through proteasome inhibition and dysregulation of proapoptotic proteins. *Free Radic Biol Med*, 2005;38:1093-1101.
  55. Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*, 2009;78:9599-9591.
  56. Reshma S, Kelvin JAD. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic Biol Med*, 2002;32:1084-1089.
  57. Rodgers KJ, Ford JL, Brunk UT. Heat shock proteins: keys to healthy ageing? *Redox Resp*, 2009;14:147-153.
  58. Roth DM, Balch WE. Modeling general proteostasis: proteome balance in health and disease. *Curr Op Cell Biol*, 2010;23:1-9
  59. Shibatani T, Nazir M, Ward WF. Alteration of rat liver 20S proteasome activities by age and food restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1996;51:B316-322.
  60. Shringarpure R, Davies KJ. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic Biol Med*, 2002;32:1084-1089.
  61. Taloczy Z, Jiang W, Virgin HW, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99:190-195.
  62. Teckman JH, An JK, Blomenkamp K, Schmidt B, Perlmutter D. Mitochondrial autophagy and injury in the liver in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004;286:G851-862.
  63. Terman A, Dalen H, Brunk UT. Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show decreased survival time and diminished autophagocytosis during amino acid starvation. *Exp Gerontol*, 1999;34:943-957.
  64. Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol*, 2007;211:134-143.
  65. Thomas JA, Mallis RJ. Aging and oxidation of reactive

- protein sulfhydryls. *Exp Gerontol*, 2001;36:1519–1526.
66. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*, 1999;68:1015-1068.
67. Winklhofer KF, Tatzelt J, Haass C. The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *Embo J*, 2008;27:336-349.
68. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J*, 2007;274:630–658.
69. Zhao L, Ackerman SL. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*, 2006;18:444–452.

### **Viviana Pérez**

Obtuvo su doctorado en Ciencias Biomédicas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Realizó su posdoctorado en el laboratorio del Dr. Arlan Richardson en el Departamento de Biología Celular y Estructural, y en el Instituto Barshop para Estudios de Longevidad y Envejecimiento, Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en San Antonio (UTHSCSA). Actualmente es profesora asistente en la misma institución y su principal tema de investigación es el estudio de la proteostasis en el envejecimiento. Es autora de diversos artículos y capítulos de libros de divulgación científica y ha obtenido financiamiento de sus proyectos a través de prestigiosas instituciones privadas tales como American Federation for Aging Studies (AFAR) y The Ellison Medical Foundation.

### **Mina Konigsberg**

Véase página 80.



**Susana Castro**

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional  
Autónoma de México.

[scastro@ibt.unam.mx](mailto:scastro@ibt.unam.mx)

a autofagia es un proceso catabólico –conservado en la evolución– que realizan las células eucariontes y que, en general, ayuda a las células a eliminar proteínas de vida media larga y organelos dañados, como la mitocondria. En los últimos años se ha descubierto parte de la maquinaria molecular que la ejecuta y las señales que la regulan. Es importante en la defensa contra infecciones por microorganismos y, cuando no funciona correctamente, favorece el surgimiento de diversas patologías como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, desórdenes en el hígado y el músculo, infarto, entre otros. Durante el envejecimiento, la eficiencia de la autofagia disminuye y su regulación se altera, siendo ésta la causa de que se acumulen macromoléculas y organelos dañados, que a su vez provocan la disminución de diversas vías catabólicas. De acuerdo con estas observaciones, diversos estímulos, ya sea genéticos o farmacológicos, que incrementan la autofagia tienen un efecto sobre el envejecimiento de diversas especies, incluyendo levadura, plantas y diversos mamíferos. La restricción calórica, que induce la longevidad en todas las especies donde se ha probado, también aumenta la autofagia. Por lo tanto, el entendimiento a nivel molecular tanto de la regulación como de la ejecución de la autofagia permitirá proponer blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos que desaceleren el envejecimiento, permitiendo mejorar la calidad de vida de los adultos mayores. Actualmente hay varios grupos de investigación en el mundo buscando estos compuestos.

### **La autofagia**

Las células cuentan con un amplio repertorio de estrategias para eliminar proteínas. La vía del proteosoma es el principal mecanismo para degradar selectivamente proteínas tanto citoplásmicas como nucleares. Por endocitosis, tanto proteínas extracelulares como membranales son enviadas al lisosoma para su degradación; éste es un mecanismo común para silenciar la señalización de receptores. En ciertas condiciones ocurre un proceso llamado crinofagia, en el que se utiliza la vía de exocitosis para redirigir vesículas secretorias al lisosoma y así degradar proteínas que no se necesiten más (Glaumann, 1989). La frecuencia de cada una de estas vías de degradación depende del tipo celular. En cambio, la autofagia es un proceso –conservado en la evolución– que todas las

células eucariontes ejecutan y que puede degradar no sólo proteínas, sino otras macromoléculas y organelos. Se han descrito tres mecanismos de autofagia para introducir el material citoplásmico al lisosoma: la autofagia mediada por chaperonas, la microautofagia y la macroautofagia (figura 1).

### **La autofagia mediada por chaperonas**

En la autofagia mediada por chaperonas se degradan determinadas proteínas citoplásmicas que son introducidas a los lisosomas molécula por molécula. Las proteínas blanco se identifican por contener una secuencia semejante al motivo formado por los aminoácidos KFERQ, que es reconocida por un complejo citoplásmico formado por la chaperona hsc70 y las co-chaperonas hip, hop, bag-1, hsp40 y hsp90. Este complejo interactúa con un receptor en la membrana lisosomal llamado LAMP-2A. Este receptor está compuesto por varias subunidades que forman un poro, a través del cual pasa la proteína a degradar, que debió haber sido previamente desdoblada. En el lumen de los lisosomas se encuentra una variante lisosomal de la hsc70 (ly-hsc70) que facilita la entrada de la proteína blanco a la matriz lisosomal, donde es finalmente degradada por enzimas hidrolíticas. El complejo de las chaperonas hsc70 se despega de la membrana lisosomal para unirse a otra proteína citoplásmica que contenga el motivo tipo KFERQ (Majeski y Dice, 2004).

### **Microautofagia**

En la microautofagia el material citoplásmico a degradar es engullido directamente por el lisosoma, ya sea por invaginación o extensión de la membrana lisosomal que rodea el material a degradar y, eventualmente, se fusiona formando una vesícula dentro del lisosoma (Mijaljica *et al.*, 2011). En levaduras se ha caracterizado la degradación de organelos o pedazos de núcleo por este mecanismo, pero en mamíferos casi no ha sido estudiado por la falta de herramientas moleculares. Sólo se ha reportado un mecanismo semejante, en el cual se secuestran proteínas solubles citoplásmicas en vesículas de endosomas tardíos y cuerpos multivesiculares. Este proceso es mediado por chaperonas, pero a diferencia de la autofagia mediada por chaperonas mencionada anteriormente, las chaperonas hsc70 entregan la carga a través de interacciones electrostáticas entre la membrana de los endosomas y las chaperonas. Este tipo de microautofagia requiere de proteínas del complejo de transporte endosomal conocidas



como ESCRT I y II para la biogénesis de las vesículas en las que se internaliza la carga (Sahu *et al.*, 2011).

### Macroautofagia

La macroautofagia se caracteriza por la presencia de vesículas especializadas que se forman a partir de unos sacos que se encuentran en el citoplasma, llamados “fagóforos” o “membranas de aislamiento”, que se elongan rodeando el material citoplásmico a degradar como si fueran macrófagos intracelulares. Los extremos de estos sacos eventualmente se fusionan, formando una vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma, dentro de la cual queda secuestrado el material a degradar. Posteriormente, el autofagosoma se fusiona a lisosomas, que aportan las enzimas hidrolíticas que degradarán tanto la membrana interna como el material citoplásmico atrapado (Xie y Klionsky, 2007). Este es el mecanismo mejor caracterizado a nivel molecular y con frecuencia se hace referencia a él como sinónimo de autofagia.

### Maquinaria central de la autofagia

En *Saccharomyces cerevisiae* se caracterizaron mutantes incapaces de crecer en fuentes pobres de nitrógeno, encontrándose más de 30 genes requeridos para la autofagia, denominados ATG (autofagia). Dichos genes están conservados en la evolución, ya que además de

presentar similitud en las secuencias y mutaciones en genes ortólogos en *D. discoideum*, en *C. elegans* o en mamíferos, también limitan la viabilidad durante la carencia de nutrientes; incluso los ortólogos de humano pueden complementar a las mutantes en genes autofágicos de levadura (Lum *et al.*, 2005). De estos genes, sólo 15 participan en todas las formas de autofagia descritas hasta el momento, por lo que se consideran la maquinaria central de la autofagia. El proceso de autofagia se puede dividir en cuatro etapas (Chen y Klionsky, 2011):

1. La inducción inicia con la activación del complejo denominado Ulk (Atg1 en levaduras), que contiene a las proteínas Atg13, FIP200 (supuesto homólogo de Atg17 en levaduras) y Atg101. El principal inhibidor del complejo Ulk es TORC1 (un complejo que contiene a la cinasa TOR, blanco de rapamicina), el cual, cuando hay suficientes nutrientes, está unido a la cinasa Ulk, a la cual fosforila; también fosforila a Atg13 en varios sitios; estas fosforilaciones inhiben la actividad de cinasa de Ulk, evitando la activación de la autofagia. En cambio, cuando llega la señal para inducir autofagia, como puede ser falta de nutrientes, TORC1 se inactiva y se disocia del complejo. Esto evita la fosforilación de Atg13 y de Ulk, permitiendo la activación de Ulk, que entonces se autofosforila, fosforila a Atg13 en un sitio diferente y a FIP200, con lo cual el complejo Ulk induce la autofagia.

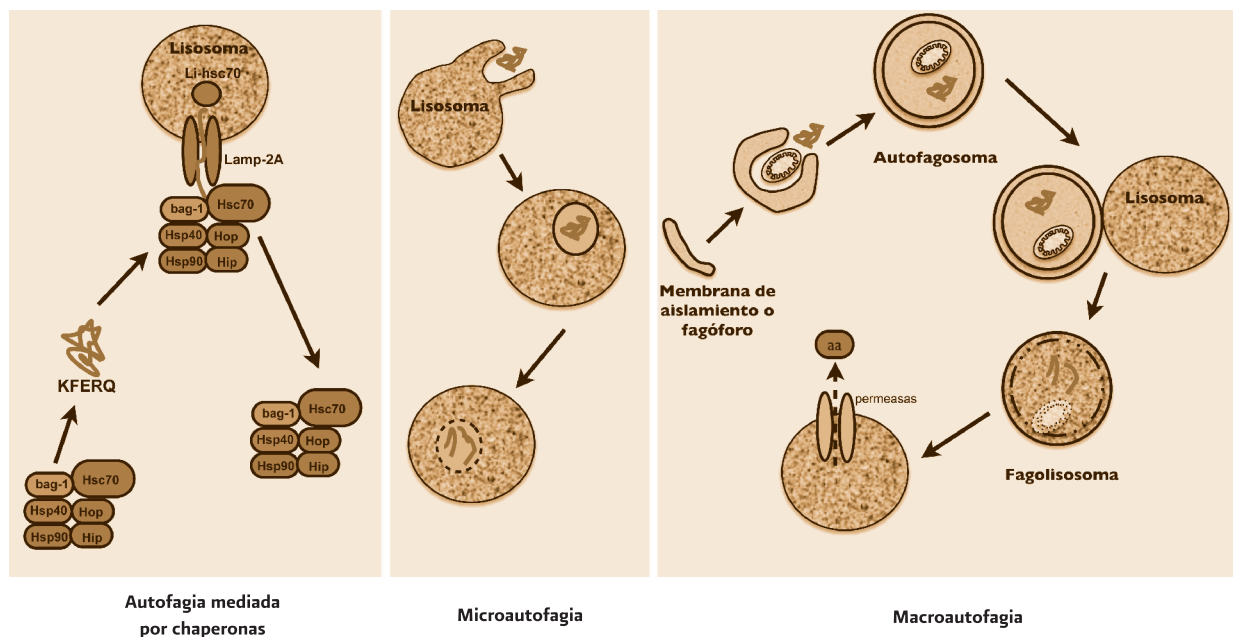


Figura 1. Caricatura de los principales tipos de autofagia. Los tamaños de las proteínas y de los organelos no están a escala. Para los detalles, véase el texto.

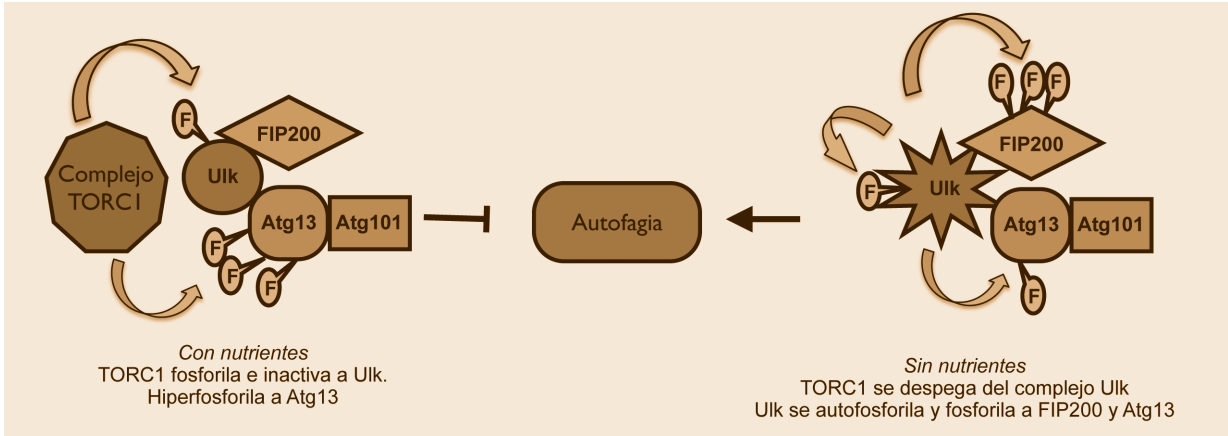


Figura 2. Regulación del complejo Ulk. Véase el texto para los detalles.

2. La nucleación es el paso en el que se reclutan fosfolípidos y proteínas para la formación del autofagosoma, a partir de la membrana de aislamiento. En levadura ocurre en un lugar determinado conocido como sitio de ensamblado del fagóforo (PAS, por sus siglas en inglés), mientras que en mamífero parece haber varios sitios de nucleación en el citoplasma. Aún no se entiende bien el mecanismo molecular de esta nucleación, pero es esencial la activación de un complejo que contiene una cinasa 3 de fosfatidil inositol (PI3K). En mamíferos hay tres cinasas PI3K, las tipo I, II y III. Mientras que la PI3K tipo I inhibe la autofagia, la PI3K tipo III la induce. El complejo formado por la PI3K-III (también conocido como Vps34) incluye a las proteínas Beclin-1 y Vps15. Este complejo es regulado positivamente por las proteínas BRAMA, Atg14L, UVRAG y Bif1, y negativamente por la proteína antiapoptótica Bcl-2 que se localiza en el retículo endoplásmico (y no la que se localiza en la mitocondria), así como por la proteína llamada Rubicán, que se une directamente a PI3K-III.

3. La expansión es el proceso mediante el cual se forma *de novo* el autofagosoma, a partir de la membrana de aislamiento o fagóforo. Aún se debate sobre la fuente de la membrana que se incorpora para elongar al fagóforo, pues se ha observado que proviene tanto del retículo endoplásmico como de la membrana plasmática o de la membrana externa de la mitocondria (Cuervo, 2010). También se ha propuesto que se unen vesículas completas. Cuando se fusionan los extremos de la vesícula en expansión, se encierra el contenido citoplásmico a degradar en vesículas de doble membrana. Dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina son necesarios para esta etapa: Atg12, que se une covalente a Atg5,

y Atg8 (en mamíferos conocida como LC3), que se une covalentemente a fosfatidiletanolamina (PE). Estas conjugaciones son catalizadas por proteínas que tienen actividad tipo E1 (Atg7, común para ambos sistemas de conjugación) y tipo E2 (Atg10 para unir a Atg12 y Atg3 para unir a Atg8). Atg4 es una proteasa que procesa al precursor de LC3 para dar lugar a la forma llamada LC3-I. Después de conjugarse a PE, se llama LC3-II y puede entonces asociarse a la membrana de aislamiento. La unión de PE a LC3 cambia su movilidad en la electroforesis, por lo que se utiliza comúnmente como marcador de autofagia, ya que se puede determinar la proporción de LC3-II mediante ensayos tipo Western blot. A pesar de ser ampliamente utilizada como marcador, el mecanismo por el cual LC3-II participa en la formación del autofagosoma se desconoce. LC3-II es removida de la membrana del autofagosoma por la misma Atg4. Se desconoce el mecanismo por el cual se regula la actividad de Atg4, para que no active a LC3 fuera de contexto o remueva a LC3-II antes de que los autofagosomas estén formados. Una vez que se unen covalentemente Atg12 y Atg5, interactúan con Atg16, formando un dímero del trímero Atg12/Atg5/Atg16. La formación de este complejo es necesaria para el procesamiento de LC3-II; de hecho se sugiere que pudiera funcionar como una E3 ligasa para la lipidación de LC3.

4. La formación del autolisosoma se lleva a cabo mediante la fusión del autofagosoma con lisosomas que contienen las hidrolasas que degradarán tanto la membrana interna como la carga. Los aminoácidos y fosfolípidos producto de la degradación son liberados al citoplasma a través de permeasas localizadas en la membrana del autolisosoma

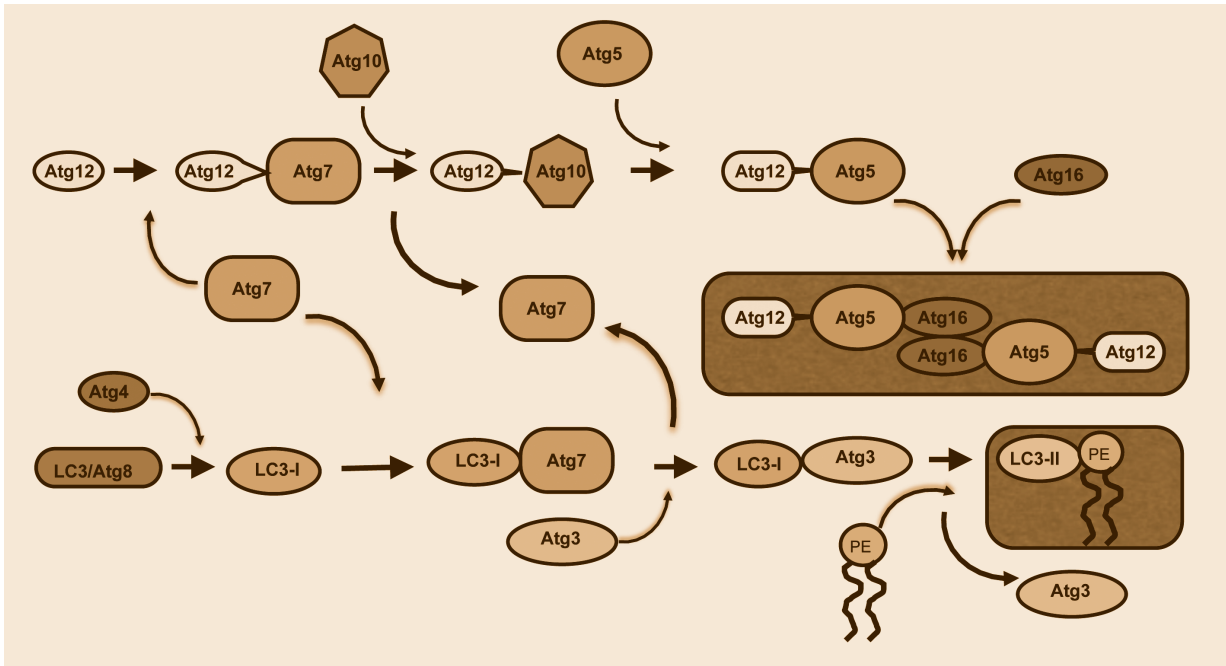


Figura 3. Sistemas de conjugación tipo ubiquitina. Véase el texto para los detalles.

para ser reciclados. Sin embargo, cuando no se necesita reutilizar la carga degradada (por ejemplo, cuando se trata de una bacteria o material tóxico) se secreta de la célula. Se desconoce el mecanismo que regula el destino de la carga.

### **Función de la autofagia**

En organismos multicelulares, la disponibilidad de nutrientes y de factores de crecimiento está íntimamente relacionada con el tamaño de las células, el cual requiere de un balance entre la síntesis y la degradación de macromoléculas. Diversos estudios demuestran que la autofagia controla el tamaño de la célula (Vellai *et al.*, 2008). Por ejemplo, desde los años 70 se observó en un estudio comparativo que el crecimiento del hígado de ratones neonatos y de adultos depende de la tasa de recambio de proteínas más que de la síntesis como tal (Conde y Scornik, 1977). En el nematodo *C. elegans*, la disminución de la autofagia (mediante mutaciones nulas de genes de la maquinaria autofágica *unc51/atg1* y *bec-1/atg6*) genera organismos de menor tamaño sin disminuir el número de células (Aladzsity *et al.*, 2007). Por tanto, modular la tasa de autofagia es una estrategia para regular el tamaño celular (Neufeld, 2003).

La autofagia regula también la proliferación celular. En

el caso de células T, promueve la proliferación, ya que células T incapaces de hacer autofagia (provenientes de un ratón *atg5*<sup>-/-</sup>) proliferan menos que las células silvestres cuando son transplantadas en ratones silvestres irradiados (Pua *et al.*, 2007). Sin embargo, en la mayoría de los casos la autofagia detiene el ciclo celular. La falta de nutrientes o de factores de crecimiento incrementa la tasa basal de autofagia y favorece la degradación de proteínas de vida media larga para generar metabolitos que permitan contender con la falta de nutrientes exógenos. En muchos organismos, estas condiciones promueven que las células adopten un estado metabólico quiescente. Cuando los nutrientes vuelven a estar disponibles, la autofagia se inhibe y las células continúan proliferando.

La autofagia favorece la estabilidad del genoma, por lo que se ha propuesto como un mecanismo protector del surgimiento de cáncer. La haploinsuficiencia de genes proautofágicos como Beclin-1 se observa comúnmente en cánceres de ovario, mama y próstata. La autofagia también protege al genoma evitando rearrreglos cromosómicos, pues la pérdida de Beclin-1 favorece la aparición de aneuploidías (Mathew *et al.*, 2007). Beclin-1 interactúa en algunas situaciones con la proteína antiapoptótica Bcl2 y tiene un efecto como supresor de tumorigénesis (Gozuacik y Kimchi, 2004; Pattingre y Levine, 2006).

La autofagia también está implicada en situaciones de estrés en las cuales la célula tiene que reorganizarse, por ejemplo, en respuesta a la hipoxia o alta temperatura. Es importante en la defensa contra infecciones por microorganismos y, cuando no funciona correctamente, favorece el surgimiento de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, infarto, sarcopenia, entre otros.

Sin embargo, la autofagia tiene un papel dual, ya que puede promover también la muerte celular cuando es inducida por señales estresantes como daño al ADN. Durante el desarrollo embrionario, la muerte celular asociada a la autofagia se denomina muerte celular programada tipo II y ocurre principalmente durante la metamorfosis de los insectos, en la formación de los miembros en aves y en la formación del paladar en los mamíferos (Gozuacik y Kimchi, 2007). La demostración experimental de que existe muerte celular programada tipo II proviene de estudios del desarrollo de la mosca, donde se observó que la degeneración de la glándula salival de la larva requiere de la autofagia para que ocurra la muerte celular (Berry y Baehrecke, 2007; Berry y Baehrecke, 2008).

Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales la autofagia provoca la muerte celular: al degradar moléculas específicas, como la catalasa (Yu *et al.*, 2006); o bien, al eliminar prolongadamente constituyentes celulares (Gozuacik y Kimchi 2007). Moléculas que modulen ya sea la magnitud de la autofagia o la especificidad de la carga podrían provocar que la autofagia pase de ser un mecanismo favorecedor de la supervivencia a uno que propicie la muerte celular.

### **Cambios de la autofagia durante el envejecimiento**

Desde hace varios años se ha observado que durante el envejecimiento la eficiencia de la autofagia disminuye, siendo ésta la causa de que se acumulen macromoléculas y organelos dañados, que a su vez provocan que diversas vías catabólicas disminuyan (Cuervo *et al.*, 2005). Esto se debe a que la abundancia de proteínas esenciales para la macroautofagia disminuye con la edad. Asimismo, ocurren cambios en la membrana lisosomal que provocan inestabilidad en Lamp2, el receptor de la autofagia mediada por chaperonas, causando que también disminuya su eficiencia. La función de los lisosomas disminuye con el envejecimiento en diversos organismos. También la regulación de la autofagia se altera con el envejecimiento.

Por ejemplo, la inducción de la autofagia por el incremento de glucagon en el suero, que es una señal que se genera normalmente entre comidas, se pierde en organismos viejos, posiblemente debido a un aumento sostenido en la señalización de insulina, causado por un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Otra característica común de las células viejas es la acumulación de material indigerible conocido como lipofuscina, que se almacena en lisosomas secundarios o autolisosomas, los cuales no se fusionan ya con autofagosomas, causando su acumulación (Mizushima *et al.*, 2008).

Las primeras células que muestran una reducción en su funcionamiento durante el envejecimiento son las células diferenciadas posmitóticas, como las neuronas y los cardiomiocitos, aunque también se afecta la capacidad de las células troncales hematopoyéticas de proliferar y de funcionar correctamente debido a la senescencia celular. Diversos experimentos hechos en ratón corroboran estas observaciones. Por ejemplo, cuando se elimina la expresión de Tsc1 –un inhibidor de mTOR– en las células troncales hematopoyéticas, con lo cual se mantiene activa a mTOR e inhibida a la autofagia, los ratones presentan un fenotipo senescente semejante al de los organismos viejos. A la inversa, cuando se inhibe a mTOR con rapamicina en ratones viejos, se restablecen las células troncales hematopoyéticas (Madeo *et al.*, 2010).

### **Efecto de la autofagia sobre la longevidad**

Se ha observado un efecto de la autofagia sobre el envejecimiento de diversas especies, incluyendo levadura, plantas y mamíferos. La autofagia parece jugar un papel central en la regulación del envejecimiento, ya que interactúa con todos los factores que regulan la longevidad; mientras que algunos genes autofágicos median el efecto de varios factores que aumentan la longevidad, la actividad de algunos otros se regula por factores que afectan la longevidad.

La restricción calórica aumenta la longevidad en todas las especies en que se ha probado. Dado que la carencia de nutrientes es el principal inductor de la autofagia, es razonable considerar que ésta sea el proceso mediador de dicho incremento en la supervivencia. De hecho, el ayuno induce la autofagia en casi todos los tipos celulares del organismo y la inducción de la autofagia aumenta la longevidad.

Hay varios ejemplos de alteraciones genéticas que afectan tanto la autofagia como la longevidad. Por ejemplo, la vía de señalización de insulina/IGF-1 regula el envejecimiento en nemátodos, moscas y mamíferos. Dicha cascada de señalización inhibe la activación de los factores de transcripción FoxO, los cuales aumentan la longevidad. En el ratón, FoxO induce la transcripción de genes autofágicos como Atg12 y Atg8. Es decir, que la señalización de insulina/IGF-1 induce tanto el envejecimiento como la inhibición de la autofagia. Las vías de señalización de TGF $\beta$  y JNK también regulan el envejecimiento y son mediados por FoxO. Debajo de FoxO actúa la calcineurina, una fosfatasa de serina y treonina que se activa por calcio y calmodulina. La inducción de la longevidad en nemátodos que no producen calcineurina depende de la autofagia (Vellai *et al.*, 2009).

La cinasa conocida como AMPK (cinasa activada por AMP) sensa los niveles de AMP/ATP y activa la autofagia a través de inhibir a TOR. Resulta que tanto AMPK como TOR regulan el envejecimiento en diversas especies. Esto implica que TOR regula la longevidad modulando la autofagia.

La sirtuina 1 es una desacetilasa de proteínas que se identificó buscando genes que aumentan la longevidad en levadura. Está conservada filogenéticamente, lo que ha permitido observar que cuando se sobre-expresa, ya sea en células de mamífero en cultivo o en organismos completos como *C. elegans*, induce la autofagia; de hecho, ratones mutantes carentes de sirtuina 1 (Sir1 $^{-/-}$ ) muestran un fenotipo semejante a ratones carentes de Atg5 (Atg5 $^{-/-}$ ), como son acumulación de organelos dañados, pérdida de la homeostasis energética y muerte perinatal (Lee *et al.*, 2008). La autofagia inducida por diversos tratamientos que aumentan la longevidad, como el resveratrol o la restricción calórica, también inducen la expresión de sirtuina 1 y, cuando ésta se inhibe, se evita la activación de la autofagia (Morselli *et al.*, 2010). Además, la autofagia es mediadora de la longevidad inducida por sirtuina 1, ya que el aumento en la longevidad se pierde cuando no hay Beclin-1 funcional. El mecanismo de inducción de autofagia por sirtuina 1 es directo ya que, además de desacetilar histonas, tiene como sustrato proteínas citoplásmicas reguladoras de la autofagia, como AMPK, Atg5, Atg7 y Atg8 (Morselli *et al.*, 2010). Sin embargo, es importante tomar en cuenta que también hay

evidencia experimental que reta una interpretación simple para el papel de las sirtuinas, ya que la inhibición de SirT1 en ratones evita algunas características de envejecimiento, como una disminución de la señalización de IGF1R y una reducción en la oxidación de proteínas en neuronas (Li *et al.*, 2008).

La proteína supresora de tumores p53 tiene una función contrastante en la regulación del envejecimiento y de la autofagia. Así como la ausencia de función de p53 favorece la formación de tumores, su hiperactivación protege de cáncer. Sin embargo, no se puede utilizar esta actividad como vacuna, pues al mismo tiempo parece que acelera el envejecimiento, ya que ratones transgénicos que expresan una mutante truncada de p53 que le confiere una actividad elevada crónica, en comparación con ratones silvestres, tienen una esperanza de vida media más corta y cambios degenerativos prematuros. La extensión de la longevidad causada por la ausencia de p53 depende de la autofagia. Sin embargo, p53 en ocasiones induce autofagia a través de la expresión de DRAM. Por lo tanto, entender el papel de p53 como regulador de la autofagia y del envejecimiento necesita más exploración. Hay más ejemplos genéticos que apoyan la idea de que la autofagia promueve la longevidad y han sido resumidos por Madeo y colaboradores (2010).

Inductores químicos de la autofagia también extienden la esperanza de vida. Por ejemplo, en todos los organismos estudiados, incluido el ratón, la administración de rapamicina (un inhibidor de la autofagia TORC1) aumenta la longevidad. Sorprendentemente, fue suficiente alimentar a los ratones con rapamicina a partir de los 600 días de edad para observar un aumento en la longevidad. Vale la pena resaltar que el efecto ocurrió en ambos sexos y en ratones heterocigóticos, para evitar un sesgo en la respuesta debido a un genotipo particular (Harrison *et al.*, 2009). Sin embargo, hace falta demostrar que el efecto de la rapamicina se debe exclusivamente a la activación de la autofagia y no a otras funciones, como una inhibición de la inflamación. Aun así, estos resultados abren la posibilidad de que manipulando la autofagia se pueda reducir la progresión de enfermedades asociadas a la vejez y así mejorar la calidad de vida de los adultos mayores. Sin embargo, vale la pena tomar en cuenta que, contrario a lo esperado, en un modelo murino de progeria se observó un aumento de la autofagia (Marino y Lopez-Otin, 2008).

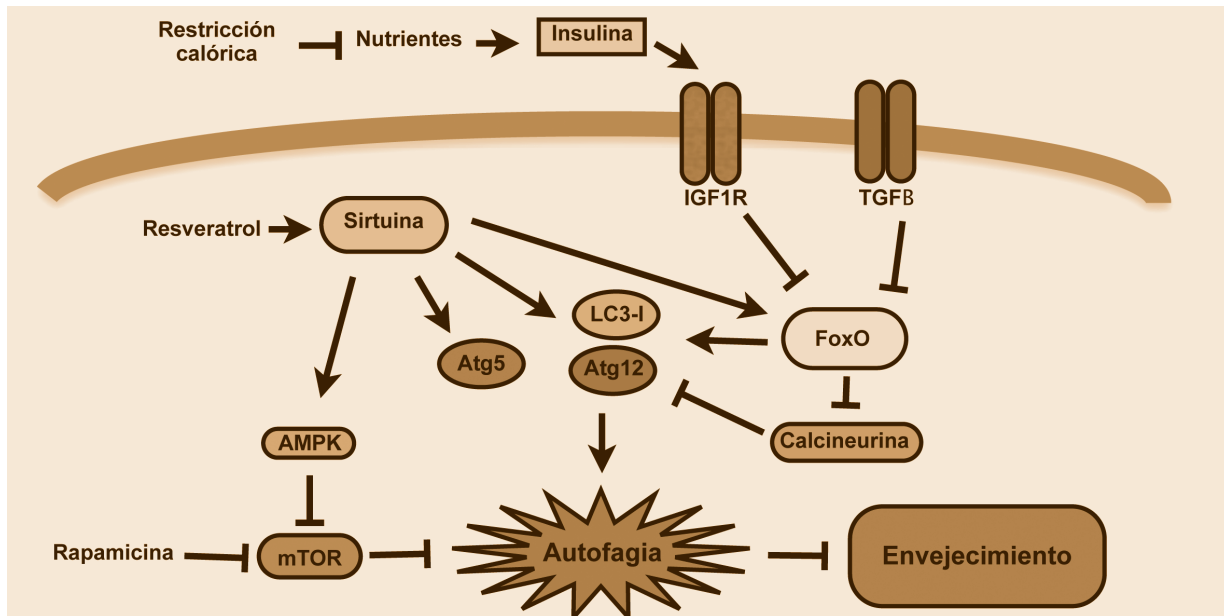


Figura 4. Diversos estímulos genéticos o ambientales retrasan el envejecimiento a través de estimular la autofagia. Para los detalles, véase el texto.

A lo largo del tiempo se acumulan daños a macromoléculas y organelos dentro de las células. El ritmo al cual se acumulan dichos daños depende de las vías de longevidad y moléculas regulatorias de la tasa de recambio molecular. Al ser el principal mecanismo eliminador de los daños moleculares y de organelos, la autofagia mantiene el recambio de componentes celulares y, con ello, estimula el rejuvenecimiento. Dado que funciona como un mecanismo celular para sostener la longevidad en diversos organismos eucariontes, es importante entender las bases moleculares de la regulación y ejecución de la autofagia. Así se podrán proponer blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos que desaceleren el envejecimiento, permitiendo mejorar la calidad de vida de los adultos mayores. De encontrarse moléculas que modulen ya sea la magnitud de la autofagia o la especificidad de la carga, se podría provocar que la autofagia cambie de ser un mecanismo favorecedor de la supervivencia, a un mecanismo de muerte celular, útil en patologías como el cáncer. Actualmente hay varios grupos de investigación en el mundo buscando compuestos que inhiban o estimulen la autofagia. Por ejemplo, se buscan moléculas pequeñas que puedan estimular la autofagia en organismos maduros y que sustituyan la restricción calórica. Cuando se logre modular la autofagia a voluntad, se podrán combatir

diversos padecimientos como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades metabólicas, trastornos del hígado y músculo, entre otros.

1. Aladzcity I, Toth ML, et al. Autophagy genes unc-51 and bec-1 are required for normal cell size in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2007;177(1):655-660.
2. Berry DL, Baehrecke EH. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell*, 2007;131(6):1137-1148.
3. Berry DL, Baehrecke EH. Autophagy functions in programmed cell death. *Autophagy*, 2008;4(3).
4. Chen Y, Klionsky DJ. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci*, 2011;124(Pt 2):161-170.
5. Conde RD, Scornik OA. Faster synthesis and slower degradation of liver protein during developmental growth. *Biochem J*, 1977;166(1):115-121.
6. Cuervo AM. The plasma membrane brings autophagosomes to life. *Nat Cell Biol*, 2010;12(8):735-737.
7. Cuervo AM, Bergamini E, et al. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy*, 2005;1(3):131-140.

8. Glaumann H. Crinophagy as a means for degrading excess secretory proteins in rat liver. *Revis Biol Celular*, 1989;20:97-110.
9. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 2004;23(16):2891-2906.
10. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol*, 2007;78:217-245.
11. Harrison DE, Strong R, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 2009;460(7253):392-395.
12. Lee IH, Cao L, et al. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008;105(9):3374-3379.
13. Li Y, Xu W, et al. SirT1 inhibition reduces IGF-1/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab*, 2008;8(1):38-48.
14. Lum JJ, DeBerardinis RJ, et al. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005;6(6):439-448.
15. Madeo F, Tavernarakis N, et al. Can autophagy promote longevity? *Nat Cell Biol*, 2010;12(9):842-846.
16. Majeski AE, Dice JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004;36(12):2435-2444.
17. Marino G, Lopez-Otin C. Autophagy and aging: new lessons from progeroid mice. *Autophagy*, 2008;4(6):807-809.
18. Mathew R, Kongara S, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev*, 2007;21(11):1367-1381.
19. Mijaljica D, Prescott M, et al. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 2011;7(7):673-82.
20. Mizushima N, Levine B, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008;451(7182):1069-1075.
21. Morselli E, Maiuri MC, et al. The life span-prolonging effect of sirtuin-1 is mediated by autophagy. *Autophagy*, 2010;6(1):186-188.
22. Neufeld TP. Body building: regulation of shape and size by PI3K/TOR signaling during development. *Mech Dev*, 2003;120(11):1283-1296.
23. Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res*, 2006;66(6):2885-2888.
24. Pua HH, Dzhagalov I, et al. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J Exp Med*, 2007;204(1):25-31.
25. Sahu R, Kaushik S, et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell*, 2011;20(1):131-139.
26. Vellai T, Bicsak B, et al. Regulation of cell growth by autophagy. *Autophagy*, 2008;4(4).
27. Vellai T, Takacs-Vellai K, et al. The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? *Trends Cell Biol*, 2009;19(10):487-494.
28. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 2007;9(10):1102-1109.
29. Yu L, Wan F, et al. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006;103(13):4952-4957.

### **Susana Castro Obregón**

Realizó sus estudios en la UNAM, dentro de los programas de Licenciatura en Investigación Biomédica Básica, Maestría en Biotecnología y Doctorado en Investigación Biomédica Básica. Se especializó en la Biología del Desarrollo, buscando entender las bases moleculares de procesos celulares como la diferenciación y la muerte celular programada. Realizó una estancia posdoctoral en el Departamento de Envejecimiento del Instituto Burnham (Burnham Institute) en La Jolla, California, Estados Unidos, donde se inició en el estudio de la muerte neuronal selectiva que ocurre en la neurodegeneración. Luego trabajó en el Instituto Buck para la Investigación sobre el Envejecimiento (Buck Institute for Age Research) en Novato, California, donde descubrió programas alternativos de muerte celular programa asociados a la neurodegeneración. Posteriormente se incorporó al Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos, donde actualmente labora. Estudia el papel de la autofagia en el destino celular: proliferación, supervivencia, diferenciación y muerte, usando como modelo células humanas y el ratón. Realizó recientemente una estancia sabática en el Instituto Max Planck de Genética Molecular en Berlín, Alemania, para introducir a la *Leishmania tarentolae* como modelo para estudiar el papel de la autofagia en la diferenciación celular. Sus estudios tienen potencial impacto en diversos procesos fisiológicos, como

el envejecimiento, y patológicos, como enfermedades metabólicas, el cáncer, la neurodegeneración y la leishmaniasis.



**Karina Hernández-Ortega**

Departamento de Medicina Genómica  
y Toxicología Ambiental, Instituto de  
Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional  
Autónoma de México.

**Clorinda Arias**

Departamento de Medicina Genómica  
y Toxicología Ambiental, Instituto de  
Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional  
Autónoma de México.

**Ricardo Quiroz Baez**

Departamento de Investigación Básica, Instituto  
de Geriátría, Secretaría de Salud.

Departamento de Medicina Genómica  
y Toxicología Ambiental, Instituto de  
Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional  
Autónoma de México.

logosibb@yahoo.com

En la última década se ha generado una gran cantidad de evidencias que relacionan a la muerte neuronal en el SNC con la desregulación de los mecanismos de proliferación celular. En este sentido, tanto en modelos *in vitro*, como en modelos animales y humanos, se ha reportado la expresión de diversos marcadores del ciclo celular en una gran variedad de condiciones neurodegenerativas. Más allá de los estudios que correlacionan la reentrada al ciclo celular en neuronas maduras con procesos que conducen a la muerte celular, en lugar de culminar en proliferación, en el presente trabajo se aborda la regulación del ciclo celular en células diferenciadas del SNC. Además, se describen las principales causas de reactivación del ciclo celular en neuronas posmitóticas y, finalmente, se mencionan las evidencias más recientes en torno a las alteraciones del ciclo celular en enfermedades neurodegenerativas, en particular en la enfermedad de Alzheimer (EA). Se destaca la hipótesis de la reactivación neuronal del ciclo celular como un evento temprano en el desarrollo de la EA, el cual se presentaría de forma previa a la aparición de sus dos principales marcadores histopatológicos (placas seniles y marañas neurofibrilares), actuando de esta manera como un factor detonante del proceso que lleva a la neurodegeneración observada en la EA.

El ciclo celular es un proceso altamente conservado en células eucariotas, a través del cual se coordina de forma ordenada tanto el crecimiento como los eventos de división celular. De manera general, el ciclo celular puede dividirse en dos periodos. El primero de éstos, la *interfase*, está compuesta por tres fases:  $G_1$  (primer intervalo), S (síntesis de ADN) y  $G_2$  (segundo intervalo); al segundo periodo se le conoce como fase M, integrado por los procesos de mitosis y citocinesis. Cuando una célula diferenciada entra en una etapa de arresto celular, se denomina estado quiescente, también conocido como  $G_0$ . La progresión a lo largo del ciclo celular está controlada por puntos de regulación, los cuales actúan como interruptores moleculares para asegurar que eventos esenciales de una fase sean completados antes de ingresar a la siguiente. Esto se logra a través de la expresión secuencial, activación e inhibición tanto de los complejos

de cinasas dependientes de ciclinas (cdks) y sus respectivas subunidades activadoras, las ciclinas, como de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (cdkis) (Grana *et al.*, 1995; Lees, 1995).

La presencia de estímulos mitogénicos permite que células quiescentes entren a la fase  $G_1$ , al promoverse la síntesis de ciclinas tipo D, las cuales se activan debido a su unión con cdk4 y cdk6. Durante la etapa tardía de  $G_1$ , la expresión y activación del complejo ciclina E/cdk2 permite la transición de  $G_1/S$ . Al inicio de la fase S, la ciclina E es degradada posibilitando la unión de cdk2 con la ciclina A. Una vez finalizada la duplicación del ADN, se forma el complejo ciclina A/cdk1, el cual conduce a la célula hacia la fase  $G_2$ . Durante la transición de  $G_2/M$ , la ciclina A es degradada, por lo que se forma un nuevo complejo, ciclina B/cdk1, el cual es necesario para la progresión de la mitosis. Al culminar la fase M, el complejo ciclina B/cdk1 se inactiva debido a que la ciclina B es degradada (Grana *et al.*, 1995) (figura 1). Aunque ha sido bien establecida la activación secuencial de las distintas Cdk (Cdk4, Cdk6, Cdk2 y Cdk1) en la progresión por el ciclo celular en mamíferos, reportes recientes indican que Cdk1 es el único factor esencial para llevar a cabo este proceso (Santamaría *et al.*, 2007).

La actividad de los complejos ciclina/cdks también es regulada por la acción de dos familias de proteínas inhibitoras. Por un lado, la familia de inhibidores INK4 (integrada por las proteínas p16, p15, p19 y p18) actúa específicamente sobre cdk4 y cdk6. Mientras que la familia Kip/Cip (constituida por las proteínas p21, p27 y p57) regula principalmente la actividad de los complejos ciclina/cdks de fase  $G_1$  y, en menor grado, la actividad del complejo ciclina B/cdk1. Por otro lado, también ha sido reportada la regulación de las cdkis, ciclinas y cdks, a nivel transcripcional, traduccional y proteolítico (Sherr y Roberts, 1999). Un ejemplo de esta regulación se observa durante el desarrollo del organismo, cuando la reducción en los niveles de ciclinas y cdks, así como el incremento del contenido de cdkis lleva a la conclusión del ciclo celular y a la diferenciación de diversos tipos celulares.

*Figura 1. Representación esquemática del ciclo celular. La interfase es el periodo no proliferativo del ciclo celular, abarcando gran parte del mismo (~95%), mientras que la fase M se limita a los procesos encaminados a la división celular. Como se observa en la imagen, el paso de una fase a otra dentro del ciclo celular está controlado por complejos ciclina/cdks, cuya acción es secuencial y altamente regulada.*

### Reactivación del ciclo celular en neuronas

El desarrollo del sistema nervioso central (SNC) en mamíferos depende de precursores neuronales, los cuales proliferan y se diferencian a neuronas a partir de zonas germinales establecidas. Una vez que han completado su ciclo celular, las neuronas posmitóticas permanecen en un estado diferenciado a lo largo de la vida (Yoshikawa, 2000). Así, la tasa neurogénica basal reportada durante la etapa adulta está determinada por pozas de precursores comprometidos a linaje neural dentro de nichos cerebrales específicos (Pevny y Rao, 2003).

En este sentido, era ampliamente aceptada la idea de que las neuronas maduras, una vez diferenciadas, abandonaban el ciclo celular de forma permanente reduciendo así la expresión de proteínas reguladoras del ciclo (Okano *et al.*, 1993). Sin embargo, actualmente existen diversas evidencias que sugieren la capacidad de las neuronas posmitóticas para reiniciar su ciclo celular. La reactivación de la maquinaria molecular encargada de este proceso en células neuronales típicamente conduce a la apoptosis y

no a eventos de proliferación celular (Wartiovaara *et al.*, 2002). Apoyando esta observación, la sobreexpresión del *antígeno T* en neuronas de retina y células de Purkinje induce muerte celular acompañada de la incorporación de BrDU (Al-Ubalbi *et al.*, 1992; Feddersen *et al.*, 1992). También se ha reportado que la incidencia de tumores cerebrales de origen neuronal es mínima, lo que sugiere una resistencia a la transformación oncogénica en este tipo celular (Heintz, 1993).

Los primeros estudios *in vivo* que señalan a la apoptosis como resultado de la reentrada aberrante al ciclo celular se realizaron en ratones *knockout* para la proteína de retinoblastoma (Rb). Rb es un supresor tumoral, el cual normalmente interrumpe el ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>. La deficiencia de Rb genera ratones no viables, sin embargo, el análisis de los embriones muestra síntesis de ADN, seguida de apoptosis tanto en el SNC como en el SNP (Lee *et al.*, 1992). Adicionalmente, neuronas simpáticas privadas de factores tróficos presentan un aumento en el ARNm de la ciclina D1 (Freeman *et al.*, 1994). En conjunto, estos datos apuntan a que la activación del ciclo celular puede estar ampliamente ligada a la muerte celular de neuronas diferenciadas.

Numerosos trabajos han demostrado que una amplia gama de condiciones patológicas son capaces de promover muerte neuronal a través de mecanismos asociados con la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, entre éstas se encuentran: pérdida del soporte trófico y/o actividad (Herrup y Busser, 1995; Hernández-Ortega *et al.* 2007), excitotoxicidad (Verdaguer *et al.*, 2004), daño al ADN (Park *et al.*, 1998), exposición a  $\beta$ -Amiloide (A $\beta$ ) (Copani *et al.*, 1999; Giovanni *et al.*, 1999; Becker y Bonni, 2004; Bhaskar *et al.*, 2009), infartos cerebrales (Hayashi *et al.*, 2000; Byrnes *et al.*, 2007), epilepsia (Nagy y Esiri, 1998) y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Arendt *et al.*, 1996; Vincent *et al.*, 1997; Busser *et al.*, 1998; Copani *et al.*, 2007; McShea *et al.*, 2007; Nagy, 2007; João *et al.*, 2009; Žekanowski y Wojda, 2009; Granic *et al.*, 2010), el Parkinson (Jordan-Sciutto *et al.*, 2003) y esclerosis lateral amiotrófica (Rangathan y Bowser, 2003).

### Reactivación del ciclo celular en la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más frecuente en la vejez, se caracteriza por un déficit cognitivo progresivo. Histopatológicamente, está definido por una pérdida sináptica y neuronal, así como por la presencia de depósitos extraneuronales de Aβ y marañas neurofibrilares intracelulares de proteína tau en estado hiperfosforilado. Se han propuesto varias hipótesis para entender la patología de la EA, incluyendo la participación de Aβ, la hiperfosforilación de tau, la inflamación y el estrés oxidante. Sin embargo, ninguna de ellas explica en su totalidad la diversidad de alteraciones bioquímicas observadas en este padecimiento.

Evidencia reciente sugiere que la reactivación del ciclo celular en neuronas podría ser un evento temprano en el desarrollo de la EA, el cual podría actuar como un factor detonante del proceso que lleva a la neurodegeneración observada en la EA. Algunas evidencias que apoyan esta idea muestran la expresión de proteínas relacionadas con la reentrada al ciclo celular en regiones neuronales susceptibles a la degeneración en la EA incluso antes de

desarrollar una patología cerebral sustancial (Arendt *et al.*, 1996; Vincent *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2001).

El primer reporte que vinculó a la reactivación del ciclo celular con la EA fue obtenido a partir del análisis post mórtem de tejido cerebral de pacientes con EA demostrando la inducción y activación de ciclina B y cdk1 (Vincent *et al.*, 1997; Busser *et al.*, 1998). Por lo anterior se ha propuesto que la actividad de cdk1 podría contribuir a la formación de placas seniles y marañas neurofibrilares. En este sentido, se ha reportado que la proteína precursora del amiloide (APP, por sus siglas en inglés) puede ser fosforilada *in vitro* por cdk1, lo cual promueve la producción de Aβ (Susuki *et al.*, 1994). También se sabe que complejos ciclina B/cdk1, aislados a partir de tejido cerebral de pacientes diagnosticados con EA, tienen la capacidad de fosforilar a la proteína tau, condición necesaria para la formación de marañas neurofibrilares (Vicent *et al.*, 1997). En conjunto, estos datos sugieren una relación entre la reactivación del ciclo celular y los dos principales marcadores histopatológicos de la EA (figura 2).

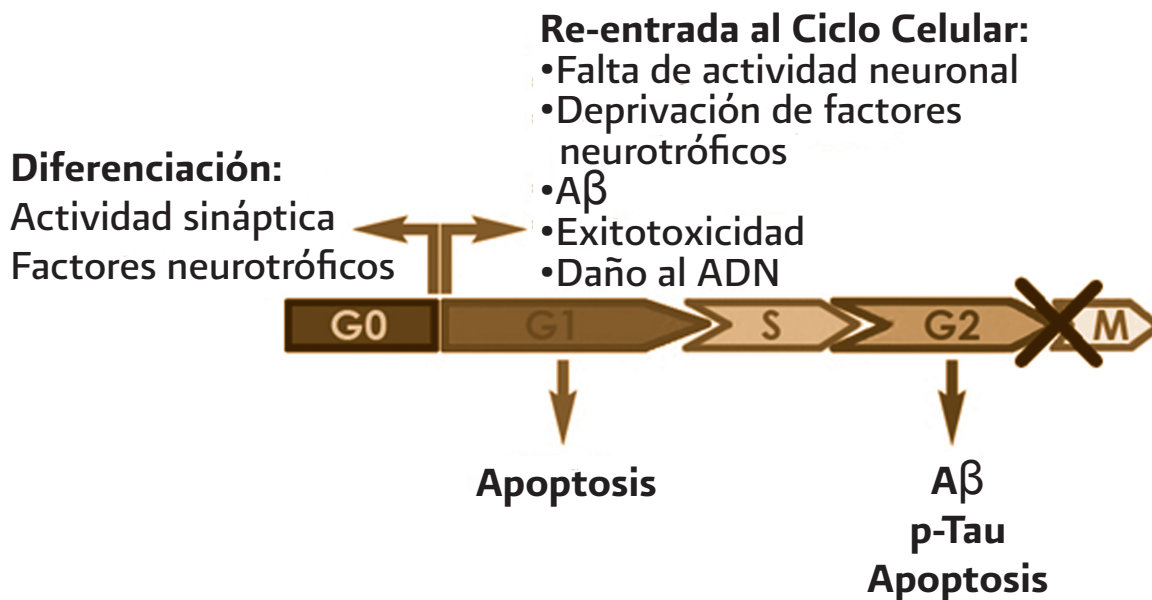


Figura 2. Eventos fisiológicos capaces de alterar el ciclo celular neuronal. Durante la fase G1 diversas señales metabólicas, ambientales o de estrés pueden actuar como estímulos mitogénicos en la maduración neuronal. Una vez alcanzada la fase G1, las neuronas pueden progresar en el ciclo celular, rediferenciarse o morir por apoptosis. Si una neurona posmitótica progresa a la fase G2 del ciclo celular, algunos componentes relacionados con la patología de la EA (como el Aβ y la proteína tau en estado hiperfosforilado) pueden ser expresados. Tanto los insultos mitogénicos como los oxidantes poseen la capacidad de alterar el estado en el que se encuentra el ciclo celular e inducir una apoptosis neuronal.

La activación del complejo ciclina B/cdk1 también se ha reportado en otras patologías que presentan alteraciones en la proteína tau, como en la enfermedad de Pick y el síndrome de Down (Nagy, 1999; Husseman *et al.*, 2000). Estudios subsecuentes demostraron la expresión neuronal de Ki-67 (proteína de unión a ADN, la cual está presente en células en proceso de división celular), ciclina E y ciclina B en pacientes con EA (Nagy *et al.*, 1997). También se ha reportado la inducción del complejo ciclina D/cdk4 y PCNA en el hipocampo y la corteza entorrinal, ambas regiones susceptibles a pérdida celular en la EA (Busser *et al.*, 1998). Así, todas estas evidencias tienden a confirmar una relación entre la reactivación del ciclo celular y la neuropatogénesis de la EA.

Sin embargo, existe una controversia, ya que el A $\beta$  *per se*, también es capaz de reactivar el ciclo celular. En este sentido, aún se desconocen los mecanismos intracelulares que podrían estar involucrados en este proceso. En células de neuroblastoma SH-SY5Y, se reportó que la señalización a través de MAPK/ERK 1/2 participa directamente en la inducción o propagación de eventos relacionados con el ciclo celular en la EA. Al inhibir esta vía con el compuesto PD98059 se previene la reentrada al ciclo celular inducida por A $\beta$ , además de reducir significativamente la muerte neuronal (Frasca *et al.*, 2004).

Resulta interesante que el A $\beta$  por sí mismo presenta un efecto mitogénico *in vitro* (McDonald *et al.*, 1998) y, por tanto, podría jugar un papel importante en la inducción de eventos relacionados con el ciclo celular (CCEs, por sus siglas en inglés) en la EA. Además, la muerte celular mediada por A $\beta$  depende, al menos en condiciones *in vitro*, de la presencia de varias moléculas relacionadas con el ciclo celular (Giovanni *et al.*, 1999). Así, el A $\beta$  podría ser tóxico *in vivo*, sólo cuando las neuronas activan la maquinaria molecular del ciclo celular.

Se ha reportado la aparición de CCEs en neuronas como un evento previo a la detección de placas seniles, lo que sugiere que el A $\beta$  podría ser el responsable de la inducción de estos CCEs. En este sentido, la inhibición de la actividad de la  $\beta$ -secretasa o una reducción en los niveles de A $\beta$  es capaz de bloquear o retrasar la aparición de los CCEs, respectivamente. En 2008, Varvel *et al.*, demostró, que formas oligoméricas, mas no monoméricas, de A $\beta$  inducían la síntesis de ADN, lo que sugiere que los

oligómeros solubles de A $\beta$  son capaces de promover la reentrada al ciclo celular en un modelo murino de EA. Diversos trabajos indican que en el tejido cerebral de pacientes con EA las neuronas expresan CCEs incluso a concentraciones muy bajas de A $\beta$ ; esto fue confirmado en un reporte reciente, el cual demostró que el A $\beta_{42}$  posee un efecto dosis dependiente capaz de activar la reentrada al ciclo celular en neuronas hipocampales adultas desde una concentración pM hasta  $\mu$ M. Los autores mostraron que, a bajas concentraciones, el A $\beta_{42}$  promueve la expresión de ciclina D (fase G1) y ciclina B1 (fase G2), pero sin la activación de un proceso apoptótico. Por el otro lado, concentraciones  $\mu$ M de A $\beta_{42}$  inducen apoptosis. Estos datos sugieren que las distintas concentraciones de A $\beta$  muestran un efecto diferencial sobre las neuronas, ocasionando la activación de distintas fases del ciclo e incluso llevándolas a la muerte (Majda *et al.*, 2008). En otros reportes, cultivos de neuronas corticales tratados con A $\beta_{40}$  incrementan de forma significativa los niveles de cdk4, fosfo-Rb y PCNA, lo que sugiere un arresto del ciclo celular previo a la fase M. Además, el A $\beta_{40}$  aumenta el número de células inmunopositivas para PCNA, las cuales también presentan fragmentación nuclear. El uso de los inhibidores de cdk5 (roscovitina) y calpaína (MDL28170) previno los cambios inducidos por A $\beta_{40}$  sobre los marcadores del ciclo celular (Lopes, 2009).

En 2001, Yang *et al.*, reportó en tejidos de pacientes con EA problemas de segregación cromosomal y aneuploidía en neuronas localizadas en áreas vulnerables, lo cual se interpretó como una evidencia de duplicación del ADN. En este estudio, se mostró que entre 3 y 4% de las neuronas piramidales del hipocampo presentaban aneuploidía, lo cual coincide con reportes previos que señalan que el porcentaje de neuronas aneuploides localizadas en regiones con placas seniles se encuentra entre 4 y 10%. En este sentido, recientemente se reportó en células bucales de pacientes con EA, así como en individuos mayores de 64 años, un incremento en la aneuploidía de los cromosomas 17 y 21 (Thomas y Fenech, 2008). Apoyando esta noción, existen múltiples estudios que sustentan la participación del A $\beta$  en el fenómeno de aneuploidía (Boeras *et al.*, 2008; Žekanowski y Wojda, 2009; Granic *et al.*, 2010). En conjunto, estos datos sugieren que la progresión del ciclo celular, además de estar relacionada con la apoptosis, puede contribuir al mecanismo patológico de la EA.

### **Daño al ADN y $\beta$ -Amiloide**

Datos genéticos, bioquímicos y neuropatológicos señalan al  $A\beta$  como un elemento clave en la patogénesis de la EA (Selkoe, 2001). Entre los mecanismos de acción propuestos para el  $A\beta$ , numerosos estudios lo han relacionado con un incremento en la generación de radicales libres, el cual conduce a un estado de estrés oxidante (Butterfield, 2002). Células PC12 incubadas en presencia de  $A\beta_{42}$  muestran un incremento en la formación de dímeros de purina; si el daño oxidante al material genético es muy extenso, éste puede conducir a la muerte neuronal (Duker *et al.*, 2001). De igual forma, en modelos transgénicos de APP, el incremento en los niveles de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OhdG), uno de los marcadores de daño oxidativo en ADN más abundantes, se ha asociado con el alto contenido de  $A\beta$ .

Adicionalmente, en cultivos de neuronas corticales expuestas a agentes que causan daño a ADN (como son los inhibidores de la topoisomerasa II, homocisteína y  $A\beta$ ), se observó un incremento en la inmunorreactividad para p53 y Cdc25 (marcador de G1/S) acompañado de apoptosis. El análisis por citometría de flujo reveló un incremento significativo en el porcentaje de neuronas en fase S al incubarse con estos agentes genotóxicos (Kruman *et al.*, 2004). En este sentido, cultivos neuronales expuestos al  $A\beta_{42}$  o a su fragmento activo  $A\beta_{25-35}$  muestran la expresión de marcadores de fase G1: fosfo-Rb, cdk4 y cdk6, los cuales se acompañan de muerte neuronal (Giovanni *et al.*, 1999). Además, el  $A\beta$  también puede llevar a la inducción de ciclina E, A y síntesis de ADN. El bloqueo de la transición de fase G1/S por oligos antisentido para ciclina D o una mutante dominante negativa de Cdk2 previene la replicación de ADN y la apoptosis inducida por  $A\beta$  (Copani *et al.*, 1999). Asimismo, se ha reportado la expresión de marcadores del ciclo celular como Cdk4, ciclina D, B, E, Ki67 y p21 en neuronas de cerebros con EA (Nagy *et al.*, 1997; Busser *et al.*, 1998). En su conjunto, estas evidencias indican que el daño oxidante al ADN causado por  $A\beta$  puede llevar a la activación del ciclo celular en neuronas posmitóticas.

Otros datos sugieren que células posmitóticas podrían utilizar moléculas como cdk4 and cdk6, las cuales normalmente controlan la proliferación celular, para mediar las señales de muerte producto de condiciones que dañan el ADN. Se ha reportado que la expresión de

inhibidores de cdk's (como p16, p21 y p27), así como el uso de bloqueadores farmacológicos de G1/S y la expresión de dominantes negativas de Cdk4 y 6 es capaz de prevenir la muerte celular en neuronas simpáticas y corticales expuestas a agentes causantes de daño a ADN como: radiación UV, citosina arabinosido (Ara C) y captotepcina (inhibidor de la ADN topoisomerasa I) (Park *et al.*, 1998). De tal manera, la reentrada al ciclo celular es un elemento crucial en la activación de la respuesta a daño a ADN en neuronas posmitóticas, expuestas a compuestos genotóxicos capaces de inducir apoptosis. En contraste, la apoptosis mediada por estímulos que no dañan el ADN, como la estaurosporina y la colchicina, es incapaz de iniciar la reactivación del ciclo celular (Kruman *et al.*, 2004). En conjunto, todos estos datos sugieren una asociación entre el  $A\beta$ , la producción de ERO y daño oxidante al ADN con la reactivación del ciclo celular y la muerte neuronal observada en la EA.

Evidencia reciente muestra la expresión de proteínas involucradas con el ciclo celular en una variedad de condiciones neurodegenerativas, las cuales se relacionan con procesos de muerte celular programada tanto en cultivos celulares como en modelos animales y humanos (Becker *et al.*, 2004). En este sentido, junto con el estrés oxidante, la desregulación del ciclo celular de neuronas susceptibles en la EA podría ser un factor capital en el inicio de la enfermedad.

### **Otras causas de reactivación del ciclo celular**

#### **Estrés oxidante**

En células proliferantes, el daño a ADN inducido por especies reactivas de oxígeno lleva a la detención del ciclo celular y promueve la reparación del ADN. Si el daño es extenso, se activa el programa de muerte apoptótica (Migliore y Coppede, 2002). Así, la supervivencia celular depende del balance entre los mecanismos de reparación de daño y las vías reguladoras de la muerte celular. El ratón mutante harlequín (Hq) fue el primer modelo *in vivo* que demostró una conexión directa entre la reentrada al ciclo celular y la neurodegeneración mediada por estrés oxidante en el envejecimiento del SNC (Klein y Ackerman, 2002). Estos ratones desarrollan ataxia progresiva y degeneración retinal asociada a la muerte de células granulares del cerebelo y de células de la retina. La mutación Hq es una inserción en el gen del factor inductor

de la apoptosis (AIF, por sus siglas en inglés). Más allá de su actividad apoptogénica (Miramar *et al.*, 2001), el AIF es una óxidoreductasa mitocondrial capaz de regular los niveles de radicales libres, específicamente de  $H_2O_2$  (Susin *et al.*, 1999; Maté *et al.*, 2002). En diversos tipos neuronales, los ratones Hq presentan un incremento en algunos marcadores de estrés oxidante como son los niveles intracelulares de  $H_2O_2$ , la lipoperoxidación, la presencia de 8-OHdG y una actividad aumentada de la catalasa. Adicionalmente, las células neuronales mostraron la expresión de PCNA y CDC47, ambos marcadores de la fase S del ciclo celular, además de la incorporación de BrdU, sugiriendo una relación entre el daño a ADN inducido por estrés oxidante y la reentrada al ciclo celular (Klein y Ackerman, 2002).

Sin embargo, una posibilidad adicional es que el estrés oxidante podría modificar algunos componentes de las vías de señalización mitogénica y reactivar de esta forma el ciclo celular (Martindale y Holbrook, 2002). Algunos reportes han propuesto la participación del  $H_2O_2$  como un factor desencadenante de la expresión de la cinasa MAP (Griendling *et al.*, 2000) y se ha sugerido que su activación es necesaria para la expresión de la ciclina D1 y la reactivación del ciclo celular en fibroblastos quiescentes en fase G0 (Lavoie *et al.*, 1996). Asimismo, tanto la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico como la de la cinasa Akt también podrían estar mediadas por el  $H_2O_2$  (Drogue, 2002). La participación de Akt en la reactivación neuronal del ciclo celular fue confirmada por Jang *et al.*, en 2009. Los autores reportaron tanto *in vitro* como *in vivo* que Akt era capaz de fosforilar a SRPK2, lo cual promueve su traslocación al núcleo, induciendo la regulación positiva de la ciclina D1.

La expresión de la ciclina D1 conduce a la reactivación del ciclo celular y a la muerte neuronal por apoptosis. La acción de SRPK2 al ser mediada por el complejo ciclina D1/cdk4 puede ser revertida con el uso de inhibidores farmacológicos de cdk4 o con INKp16, una proteína endógena inhibidora del complejo ciclina D1-cdk4/6. Al inhibir a Cdk4 se bloquea la actividad del complejo ciclina D1/Cdk4, previniéndose la fosforilación de la proteína Rb, lo cual permite la supervivencia neuronal. Estos datos concuerdan con reportes previos que muestran que formas dominantes negativas de cdk4 y cdk6, así como bloqueadores de la transición G1/S son capaces de

prevenir la muerte neuronal (Park *et al.*, 2000). En un modelo de muerte apoptótica en células granulares, se mostró que la inhibición de la vía Akt, a través del uso de SP600125 (inhibidor específico de la cinasa JNK), muestra efectos neuroprotectores y previene la reentrada al ciclo celular. Adicionalmente, SP600125 es capaz de inhibir la expresión tanto de las ciclinas D1 y E, como de la proteína E2F-1 (Yeste-Velasco *et al.*, 2009). En este contexto, algunos trabajos sugieren una reactividad cruzada entre JNK y Akt (Shimoke *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2005).

Un estudio reciente utilizando un modelo murino nestina-CreER mostró una síntesis aberrante de ADN en neuronas hipocampales no apoptóticas después de la inducción cerebral de isquemia-hipoxia (Burns *et al.*, 2007). Estos datos concuerdan con estudios previos, los cuales demostraron que CDK5 controla el estado de arresto celular en neuronas posmitóticas (Cicero y Herrup, 2005); en este trabajo también encontraron una reducción selectiva en los niveles de CDK5 en las regiones estriatales e hipocampales ipsilaterales a la lesión, lo que sugiere que el daño isquémico es capaz de alterar el estado de arresto celular, conduciendo a la síntesis aberrante de ADN.

A fin de examinar el papel exacto que la reentrada al ciclo celular tiene en el mecanismo patogénico de la disfunción y muerte neuronal en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA, Lee *et al.*, desarrollaron en 2009 un modelo transgénico en el cual las neuronas del prosencéfalo pueden ser inducidas a entrar al ciclo celular a través del uso de un protooncogen, MYC. En este modelo se ha reportado la reentrada al ciclo celular (determinado por la expresión de PCNA, Ki-67, ciclina D1 y la duplicación de ADN) en neuronas maduras, lo cual conduce a muerte celular, gliosis y déficit cognitivo. Estos hallazgos ofrecen evidencia convincente de que la desregulación en la reentrada al ciclo celular puede conducir a la neurodegeneración *in vivo*.

### **Pérdida de soporte trófico y/o actividad**

La apoptosis neuronal inducida por la pérdida de soporte trófico se acompaña de cambios en la expresión de ciclinas y en la actividad de las cdk (Freeman *et al.*, 1994; Gao y Zalenka, 1995). El uso de agentes que inhiben la progresión del ciclo celular, incluyendo bloqueadores

de la transición de G1/S, así como inhibidores de cdk, promueven la supervivencia de células PC12 y neuronas simpáticas privadas de suero y/o NGF (Farinelli y Greene, 1996).

Los ratones *staggerer* y *luncher* representan modelos valiosos *in vivo* de pérdida neuronal inducida por la depleción de factores tróficos, condición que podría ocurrir en desórdenes presentes durante el desarrollo. La mutación *staggerer* es una delección en el gen  $ROR_{\alpha}$ , el cual codifica a un receptor huérfano nuclear a hormonas. Como resultado de esta delección, las células de Purkinje no se desarrollan completamente y no forman sinapsis con los axones de las células granulares del cerebelo (Hamilton *et al.*, 1996). En consecuencia, la población completa de neuronas granulares del cerebelo y las neuronas de la oliva inferior mueren, muy probablemente como resultado de la pérdida de factores tróficos derivados del blanco celular. La apoptosis de estas neuronas es precedida por la expresión de ciclina D y PCNA, indicando la reactivación del ciclo celular. Esta reactivación incluye la síntesis de ADN evidenciada por la incorporación de BrdU (Herrup y Busser, 1995).

El defecto que subyace en el ratón *luncher* es una mutación en el gen del receptor ionotrópico a glutamato, que resulta en la apertura constitutiva de los canales y la consecuente despolarización permanente de las células de Purkinje. En el ratón *luncher*, las células de Purkinje del cerebelo mueren en forma preprogramada. La degeneración de las células de Purkinje comienza el día P8, resultando en la eliminación de 90% de la población original de estas células. Luego de la eliminación de las células de Purkinje, la mayoría de las neuronas granulares mueren vía apoptosis (Doughty *et al.*, 2000). Como en el caso del ratón *staggerer*, estas neuronas expresan marcadores de ciclo celular de fases G1 y S, ciclina D, PCNA y BrdU antes de la muerte celular (Herrup y Busser, 1995).

Respecto a la pérdida de actividad, se sabe que induce apoptosis en neuronas posmitóticas. En neuronas granulares cerebelares de ratas en desarrollo, la eliminación de actividad promueve la inducción de E2F, el cual, al asociarse con el promotor de  $cdk1$ , promueve su transcripción y conduce a apoptosis mediada por la activación de  $cdk1$  (Konishi y Bonni, 2003). En conjunto, estos datos aportan evidencias de que tanto la pérdida

de soporte trófico como la de la actividad de neuronas posmitóticas conducen a la reactivación de reguladores del ciclo celular, la cual puede culminar en la muerte neuronal.

### **Excitotoxicidad**

La excitotoxicidad contribuye al daño neuronal que ocurre en condiciones patológicas incluyendo la isquemia cerebral, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. El glutamato y sus aminoácidos excitadores relacionados, como el kainato, causan muerte neuronal en el SNC al administrarse *in vivo* e *in vitro* (Coyle y Puttfarcken, 1993). Los mecanismos implicados en la excitotoxicidad no se han comprendido completamente, sin embargo, las evidencias indican que incluye múltiples mecanismos que involucran diferentes vías de señalización.

Un estudio en neuronas granulares de cerebelo reportó un incremento en la expresión de ciclina D1 luego de la inducción de apoptosis generada por la incubación con ácido kaínico (AK) (Giardina *et al.*, 1998). Posteriormente, en este mismo tipo celular, se observó un incremento en la expresión de proteínas implicadas en la fase S, PCNA y E2F, el cual se acompañó de un aumento en la incorporación de BrdU. Sin embargo, el tratamiento con flavopiridol, un inhibidor de cdk disminuyó la expresión de los marcadores de ciclo celular y promovió la supervivencia de estas células (Verdaguer *et al.*, 2004).

La administración sistémica de AK induce la expresión en altos niveles de ciclina D y de  $cdk4$  en la corteza piriforme, amígdala e hipocampo (Park *et al.*, 2000). El uso de oligonucleótidos antisentido de estas proteínas suprime la muerte de células neuronales inducida por AK (Ino y Chiba, 2001). Los datos anteriores sustentan el papel de los reguladores del ciclo celular en la muerte neuronal evocada por estrés excitotóxico y señala un blanco terapéutico potencial para el tratamiento de patologías relacionadas con la excitotoxicidad.

### **Isquemia**

En el cerebro, el daño isquémico inicial tiene diversas consecuencias como el daño a ADN, excitotoxicidad y producción de radicales libres. Típicamente la muerte celular asociada a isquemia es la necrosis. Sin embargo, diversas evidencias bioquímicas y morfológicas señalaron la ocurrencia de apoptosis (Rink *et al.*, 1995). Los datos



referentes a la participación de eventos relacionados con el ciclo celular en la isquemia cerebral se han obtenido principalmente de modelos en roedores. Se ha descrito la expresión de ciclina D, G, cdk4, cdk2, fosfo-Rb, E2F y PCNA previa a la apoptosis en modelos de isquemia tanto focal como global (Katchnov *et al.*, 2001). Estos datos se complementan con el hecho de que la administración de flavopiridol, un inhibidor de cdk, reduce significativamente el daño al tejido (Osuga, 2000), además de mejorar el desempeño conductual posterior a un accidente isquémico. Las observaciones anteriores sugieren que la reentrada aberrante al ciclo celular favorece la degeneración neuronal luego de un evento isquémico y plantea la posibilidad de la administración de inhibidores de cdk como estrategia terapéutica.

### **Otras enfermedades neurodegenerativas**

La apoptosis neuronal asociada a la reactivación del ciclo celular también se ha observado en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y en el síndrome de Down (SD). En neuronas motoras de la médula espinal y en neuronas de la corteza motora de pacientes con ELA se ha encontrado un incremento en los reguladores ciclina D1, cdk4, Rb hiperfosforilado y E2F (Rangathan y Bowser, 2003). Por otro lado, en neuronas hipocámpales piramidales de pacientes con SD se reportó un incremento en la expresión de cdk4. Las neuronas en las que se observó la expresión de cdk4 también presentaron marañas neurofibrilares y degeneración granulovacuolar, sugiriendo una relación entre reentrada al ciclo celular y patología (Nagy, 1999).

En resumen, la activación del ciclo celular parece ser incompatible con el estado diferenciado de las neuronas. La reentrada al ciclo celular resulta en la muerte neuronal, principalmente por la vía apoptótica. Diferentes estímulos como la exposición a estrés oxidante, a A $\beta$ , la excitotoxicidad y condiciones como el daño a ADN, la pérdida de actividad y/o soporte trófico, pueden llevar a la activación del ciclo celular en neuronas *in vivo* e *in vitro*. Existen evidencias acerca de que estos estímulos y condiciones pueden tener un papel relevante en algunas enfermedades neurodegenerativas. Considerando los diferentes mecanismos patológicos en estas enfermedades, es probable que tipos neuronales específicos puedan responder a través de diferentes vías de señalización. El estudio detallado de las vías de señalización activadas

por estas condiciones y estímulos permitirá la mejor comprensión de estos desórdenes neurodegenerativos. Por otro lado, la interrogante de si los eventos descritos en esta revisión constituyen un ciclo mitótico regular o algún proceso diferente requiere ser resuelta. Al igual que definir si la reactivación del ciclo celular es un mecanismo que lleva únicamente a la muerte celular o en algunos casos puede tratarse de una respuesta de protección.

1. Al-Ubaldi MR, Hollifield JG, Overbeek PA, Baehr W. Photoreceptor degeneration induced by the expression of 40 simian virus large tumor antigen in the retina of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci*, 1992;89:1194-1198.
2. Arendt T, Rödel L, Gärtner U, Holzer M. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 1996;7:3047-3049.
3. Becker EBE, Bonni A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog Neurobiol*, 2004;72:1-725.
4. Bhaskar K, Miller M, Chludzinski A, Herrup K, Zagorski M, Lamb BT. The PI3K-Akt-mTOR pathway regulates A $\beta$  oligomer induced neuronal cell cycle events. *Mol Neurodegener*, 2009;4:14-31.
5. Boeras DI, Granic A, Padmanabhan J, Crespo NC, Rojiani AM, Potter H. Alzheimer's presenilin 1 causes chromosome missegregation and aneuploidy. *Neurobiol Aging*, 2008;29:319-328.
6. Burns KA, Ayoub AE, Breunig JJ, Adhami F, Weng WL, Colbert MC, Rakic P, Kuan CY. Nestin-CreER Mice Reveal DNA Synthesis by Nonapoptotic Neurons following Cerebral Ischemia-Hypoxia. *Cereb Cortex*, 2007;17:2585-2592.
7. Busser J, Geldmacher DS, Herrup K. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal death in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci*, 1998;18:2801-2807.
8. Butterfield DA. Amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) induced oxidative stress and neurotoxicity: Implications for the neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. *Free Radic Res*, 2002;36:1307-1313.
9. Cicero S, Herrup K. Cyclin-dependent kinase 5 is essential for neuronal cell cycle arrest and differentiation. *J Neurosci*, 2005;25:9658-9668.
10. Copani A, Caraci F, Hoozemans JJ, Calafiore M,

- Sortino MA, Nicoletti F. The nature of the cell cycle in neurons: focus on a “non-canonical” pathway of DNA replication causally related to death. *Biochim Biophys Acta*, 2007;1772:409-412.
11. Copani A, Condorelli F, Caruso A, Vancheri C, Sala A, Giuffrida Stella AM, Canonico PL, Nicoletti F, Sortin, MA. Mitotic signaling by  $\beta$ -amyloid causes neuronal death. *FASEB J*, 1999;13:2225-2234.
  12. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*, 1993;262:689-695.
  13. Doughty ML, De Jaggerr PL, Korsmeyer SJ, Heintz N. Neurodegeneration in lurcher mice occurs via multiple cell death pathways. *J Neurosci*, 2000;20:3687-3694.
  14. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002;82:47-95.
  15. Duker NJ, Sperling J, Soprano KJ, Druin DP, Davis A, Ashworth R.  $\beta$ -Amyloid protein induces the formation of purine dimers in cellular DNA. *J Cell Biochem*, 2001;81:393-400.
  16. Farinelli SA, Greene LA. Cell cycle blockers mimosine, ciclopirox and derefoxamine prevent the death of PC12 cells and postmitotic sympathetic neurons after removal of trophic support. *J Neurosci*, 1996;16:1150-1162.
  17. Feddersen RM, Ehlenfeldt R, Yunis WS, Clark HB, Orr HT. Disrupted cerebellar cortical development and progressive degeneration of Purkinje cells in SV40 T antigen transgenic mice. *Neuron*, 1992;9:955-966.
  18. Frasca G, Chiechio S, Vanchery C, Nicoletti F, Copani A, Sortino MA.  $\beta$ -amyloid-activated cell cycle in SH-SY5Y neuroblastoma cells: correlation with the MAP kinase pathway. *J Mol Neurosci*, 2004;22:231-236.
  19. Freeman RS, Estus S, Johnson Jr EM. Analysis of cell cycle related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron*, 1994;12:343-355.
  20. Gao CY, Zalenka PS. Induction of cyclin B and H1 kinase activity in apoptotic PC12 cells. *Exp Cell Res*, 1995;219:612-618.
  21. Giardina SF, Cheung NS, Reid MT, Beart PM. Kainate-induced apoptosis in cultured murine cerebellar granule cells elevates expression of the cell cycle gene cyclin D1. *J Neurochem*, 1998;71:1325-1328.
  22. Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, Slack R, Park DS. Involvement of cell cycle element, cyclin dependent kinases, pRb and E2F $\times$ DP, in  $\beta$ -amyloid induced neuronal death. *J Biol Chem*, 1999;274:19011-19016.
  23. Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclins dependent kinases (CDKs) growth supresor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Oncogene*, 1995;11:211-219.
  24. Granic A, Padmanabhan J, Norden M, Potter H. Alzheimer A $\beta$  Peptide Induces Chromosome Mis-Segregation and Aneuploidy, Including Trisomy 21: Requirement for Tau and APP. *Mol Biol Cell*, 2010;21:511-520.
  25. Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000;20:2175-2183.
  26. Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrok AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, Russell LB, Mueller KL, van Berkel B, Birren BW, Kruglyak L, Lander ES. Disruption of the nuclear hormone receptor ROR in staggerer mice. *Nature*, 1996;379:736-739.
  27. Heintz N. Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration?. *Trends Biochem Sci*, 1993;18:157-159.
  28. Hernández-Ortega K, Ferrera P, Arias C. Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer’s disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *J Neurosci Res*, 2007;85:1744-1751.
  29. Herrup K, Busser JC. The induction of multiple cell cycle events precedes target-related neuronal death. *Development*, 1995;121:2385-2395.
  30. Husseman JW, Nochlin D, Vincent I. Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*, 2000;21:815-828.
  31. Ino H, Chiba T. Cyclin dependent kinase 4 and Cyclin D1 are required for excitotoxin-induced neuronal cell death in vivo. *J Neurosci*, 2001;21:6088-6094.
  32. Jang SW, Liu X, Fu H, Rees H, Yepes M, Levey A, Ye K. Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 Mediates Cell Cycle and Cell Death in Neurons. *J Biol Chem*, 2009;284:24512-24525.
  33. João P. Lopes, Catarina R. Oliveira and Paula Agostinho. Cdk5 acts as a mediator of neuronal

- cell cycle re-entry triggered by amyloid- $\beta$  and prion peptides. *Cell Cycle*, 2009;8:97-104.
34. Jordan-Sciutto KL, Dorsey R, Chalovich EM, Hammond RR, Achim CL. Expression patterns of retinoblastoma protein in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003;62:68-74.
  35. Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf R, Brück W, Hörtnagi H, Bhrde P, Endress M. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin dependent kinases inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci*, 2001;21:5045-5053.
  36. Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 2003;111:785-793.
  37. Konishi Y, Bonni A. The E2F-Cdc2 cell-cycle pathway specifically mediates activity deprivation-induced apoptosis of postmitotic neurons. *J Neurosci*, 2003;23:1649-1658.
  38. Kruman II, Wersto RP, Cardozo-Pelaez F, Smilenov L, Chan SL, Chrest J, Emokpae R Jr, Gorospe M, Mattson MP. Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron*, 2004;41:549-561.
  39. Lavoie JN, Rivard N, L'Allemain G, Pouysségur J. A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. *Prog Cell Cycle Res*, 1996;2:49-58.
  40. Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, Lee WH, Bradley A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature*, 1992;359:288-294.
  41. Lee HG, Casadesus G, Nunomura A, Zhu X, Castellani RJ, Richardson SL, Perry G, Felsher DW, Petersen RB, Smith MA. The neuronal expression of MYC causes a neurodegenerative phenotype in a novel transgenic mouse. *Am J Pathol*, 2009;174:891-897.
  42. Lees E. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 1995;7:773-780.
  43. Lopes JP, Blurton-Jones M, Yamasaki TR, Agostinho P, LaFerla FM. Activation of Cell Cycle Proteins in Transgenic Mice in Response to Neuronal Loss but not Amyloid- $\beta$  and Tau Pathology. *J Alzheimers Dis*, 2009;16:541-549.
  44. Majda S, Zarifkara A, Rastegara K, Takhshidb MA. Different fibrillar A $\beta$ 1-42 concentrations induce adult hippocampal neurons to reenter various phases of the cell cycle *Brain Res*, 2008;1218:224-229.
  45. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signalling for suicide or survival. *J Cell Physiol*, 2002;192:1-15.
  46. Maté MJ, Ortiz-Lombardía M, Boitel B, Haouz A, Tello D, Susin SA, Penninger J, Kroemer G, Alzari PM. The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nature Struct Biol*, 2002;9:442-446.
  47. McDonald, DR, Bamberger ME, Combs CK, Landreth GE.  $\beta$ -Amyloid fibrils activate parallel mitogen-activated protein kinase pathways in microglia and THP1 monocytes. *J Neurosci*, 1998;18:4451-4460.
  48. McShea A, Lee HG, Petersen RB, Casadesus G, Vincent I, Linford NJ, Funk JO, Shapiro RA, Smith MA. Neuronal cell cycle re-entry mediates Alzheimer disease-type changes. *Biochim Biophys Acta*, 2007;1772:467-472.
  49. Migliore L, Coppede F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutant Res*, 2002;512:135-153.
  50. Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem*, 2001;276:16391-16398.
  51. Nagy Z, Esiri MM, Cato AM, Smith AD. Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1997;94:6-15.
  52. Nagy Z. Mechanisms of neuronal death in Down's syndrome. *J Neural Transm Suppl*, 1999;57:233-245.
  53. Nagy Z. The dysregulation of the cell cycle and the diagnosis of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2007;1772:402-408.
  54. Okano HJ, Pfaff DW, Gibbs RB. RB and Cdc2 expression in brain: correlations with 3H-thymidine incorporation and neurogenesis. *J Neurosci*, 1993;13:2930-38.
  55. Osuga H. Cyclin dependent kinases as a therapeutic target for stroke. *Proc Natl Acad Sci*, 2000;97:10254-10259.
  56. Park D, Obeidat A, Giovanni A, Greene L. Cell cycle regulators in neuronal death evoked by excitotoxic stress: implications for neurodegeneration and its treatment. *Neurobiol Aging*, 2000;21:771-781

57. Park DS, Morris EJ, Padmanabhan J, Shelanski ML, Geller HM, Greene LA. Cyclin dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. *J Cell Biol*, 1998;143:457-467.
58. Pevny L, Rao MS. The stem-cell menagerie. *Trends Neurosci*, 2003;26:351-59.
59. Rangathan S, Bowser S. Alterations in G1 to S phase cell cycle regulators during amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol*, 2003;162:823-835.
60. Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol*, 1995;147:1575-1583.
61. Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, 2007;448:811-816.
62. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev*, 2001;81:741-766.
63. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1 phase progression. *Genes Dev*, 1999;13:1501-1512.
64. Shimoke K, Yamagishi S, Yamada M, Ikeuchi T, Hatanaka H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-Terminal Kinase Activity In Apoptosis Of Cultured Cerebellar Granule Neurons. *Brain Res Dev Brain Res*, 1999;112:245-253.
65. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, 2005;9:59-71.
66. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzmi N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette M, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 1999;397: 441-446.
67. Susuki T, Oishi M, Marshak D, Czernik A, Nairn A, Greengard P. Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *The EMBO J*, 1994;13:1114-1122.
68. Thomas P, Fenech M. Chromosome 17 and 21 aneuploidy in buccal cells is increased with ageing and in Alzheimer's disease. *Mutagenesis*, 2008;23:57-65.
69. Varvel NH, Bhaskar K, Patil AR, Pimplikar SW, Herrup K, Lamb BT. A $\beta$  Oligomers Induce Neuronal Cell Cycle Events in Alzheimer's Disease. *J Neurosci*, 2008;28:10786-10793.
70. Verdaguer E, Jiménez A, Canudas AM, Jorda EG, Sureda X, Pallas M, Camins A. Inhibition of Cell Cycle Pathway by Flavopiridol Promotes Survival of Cerebellar Granule Cells after an Excitotoxic Treatment. *The J Pharmacol and Exp Therap*, 2004;308:609-6.
71. Vincent I, Jicha G, Rosado M, Dickson D. Aberrant expression of mitotic Cdc2/Cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J Neurosci*, 1997;17:3588-3598.
72. Wartiovaara K, Barnabe-Heider F, Miller FD, Kaplan DR. N-myc promotes survival and induces S-phase entry of postmitotic sympathetic neurons. *J Neurosci*, 2002;22:815-824.
73. Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2001;21:26661-26668.
74. Yeste-Velasco M, Folch J, Casadesús G, Smith Ma, Pallàs M, Camins A. Neuroprotection By C-Jun NH2-Terminal Kinase Inhibitor SP600125 Against Potassium Deprivation-Induced Apoptosis Involves The Akt Pathway And Inhibition Of Cell Cycle Reentry. *Neuroscience*, 2009;159:1135-1147.
75. Yoshikawa K. Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci Res*, 2000;37:1-14.
76. Žekanowski C, Wojda U. Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp*, 2009;69:232-253.

**Karina Hernández Ortega**

Licenciada en Investigación Biomédica Básica por la Universidad Nacional Autónoma de México. En su trabajo de tesis de licenciatura describió la expresión de marcadores de ciclo celular y de proteínas implicadas en la enfermedad de Alzheimer posterior a una lesión excitotóxica en el hipocampo de la rata. Candidata a doctora en Ciencias por la UNAM. Su tesis doctoral se centra en la participación de la cinasa ERK1/2 en la reactivación del ciclo celular en neuronas hipocampales maduras.

**Clorinda Arias Álvarez**

Médica cirujana y doctora en Ciencias por la Universidad Nacional Autónoma de México. Realizó un posdoctorado en Neuropatología Molecular en el Albert Einstein College of Medicine, Nueva York. Es investigadora titular C del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Ha publicado más de 50 artículos de investigación en el área de neurociencias y en particular sobre modificaciones neuroquímicas relacionadas con patologías nerviosas como la epilepsia y la neurodegeneración. Desde hace 18 años trabaja en aspectos celulares y moleculares de la muerte neuronal asociada con el envejecimiento patológico y la enfermedad de Alzheimer.

**Ricardo David Quiroz Baez**

Licenciado en Investigación Biomédica Básica y doctor en Ciencias por la Universidad Nacional Autónoma de México. Ha trabajado en laboratorios de investigación básica en los institutos de Investigaciones Biomédicas y de Fisiología Celular de la UNAM. Se ha interesado en el estudio de los procesos celulares y moleculares asociados con la enfermedad de Alzheimer centrándose en el papel del estrés oxidante sobre el metabolismo de la proteína precursora del amiloide. También ha trabajado en el desarrollo de modelos de muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas, basándose en el uso de líneas celulares humanas. Actualmente es investigador en Ciencias Médicas del Instituto de Geriátrica, Secretaría de Salud.



**Perla Moreno Castilla**

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología  
Celular, Universidad Nacional Autónoma de  
México.

perlamc@ifc.unam.mx

**Luis Bernardo Tovar y Romo**

Department of Neurology, The Johns Hopkins  
University School of Medicine.

ltovary1@jhmi.edu

La enfermedad de Alzheimer es un padecimiento neurodegenerativo que se caracteriza principalmente por la pérdida de la memoria y, en sus etapas más avanzadas, incapacita a los individuos afectados para llevar una vida independiente. Ocurre sobre todo en la vejez y, debido al fenómeno de envejecimiento poblacional que está sucediendo en México, constituye un problema de salud pública con impacto creciente. Aunque actualmente existe un avance significativo en el entendimiento de algunos procesos biológicos que subyacen a esta enfermedad, aún no se conocen con precisión los mecanismos responsables de su origen. Sin embargo, se sabe que el procesamiento aberrante de algunas proteínas, incluyendo a la proteína precursora del amiloide y la proteína tau, está involucrado de manera importante en la neuropatología de esta enfermedad. También se han descrito una serie de alteraciones genéticas que incrementan la susceptibilidad a padecer la enfermedad de Alzheimer.

A partir de estos hallazgos se han desarrollado modelos experimentales en los que se estudian los mecanismos celulares y moleculares que posiblemente contribuyen a la generación de las alteraciones neurológicas en este padecimiento. Estos modelos también son útiles para el desarrollo de las estrategias terapéuticas necesarias para brindar a los pacientes un tratamiento efectivo que detenga el progreso de esta enfermedad y que, en el mejor escenario posible, la reviertan. Este capítulo presenta una síntesis de las alteraciones genéticas, el procesamiento aberrante de proteínas y la desregulación del ciclo celular en la enfermedad de Alzheimer y algunos modelos experimentales empleados en su estudio.

A medida que la población mundial envejece, la enfermedad de Alzheimer (EA) cobra importancia como un problema de salud pública al ser la principal causa de demencia en adultos mayores de 65 años. La EA se caracteriza por un fuerte deterioro cognitivo y pérdida de la memoria; durante su progreso los pacientes pierden por completo la capacidad intelectual y la habilidad para desarrollar actividades básicas como vivir de manera independiente. A partir del inicio de la enfermedad, los pacientes sobreviven un promedio de 10-20 años y, por

lo general, mueren debido a complicaciones relacionadas a la EA como reflejos anormales, rigidez muscular, dificultad para mantener una postura adecuada, dificultad para deglutir y pérdida de peso, lo que en conjunto les confiere una mayor susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas como neumonía (Chouinard, 2000; Feinberg, 2003). A pesar de que la EA se describió por primera vez en 1906, actualmente permanece sin cura o tratamiento efectivo y es uno de los trastornos neurológicos que recibe mayor atención en la investigación básica y clínica y en el desarrollo de programas sociales para la atención a pacientes, familiares y cuidadores.

El síntoma predominante y característico de la EA es el declive cognitivo progresivo, principalmente debido a la pérdida de neuronas y sinapsis en el hipocampo (West, 1993). Además de los síntomas clínicos, se sabe que existen cambios patológicos en el cerebro que consisten en una marcada atrofia con una pérdida neuronal significativa, acompañados de la acumulación anormal de las proteínas beta amiloide ( $\beta A$ ) y tau hiperfosforilada en patrones particulares de agregación. La identificación de la neuropatología típica en un análisis post mórtem permite el diagnóstico definitivo de la EA.

En cuanto a la etiología, a la fecha se han caracterizado varias mutaciones en genes que han sido implicados en esta enfermedad y se sabe que no sólo factores genéticos, sino también ambientales y su interacción, están involucrados en el desarrollo de la EA. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes se desconoce la causa de la enfermedad, a pesar de los avances que han permitido entender los factores heredables y de propensión a la EA y al mejor entendimiento de los mecanismos de acumulación de las proteínas  $\beta A$  y tau. Tampoco se sabe si la agregación de estas proteínas es la causa de la neurodegeneración o un marcador que acompaña el progreso de la enfermedad.

En este capítulo presentaremos los genes y mutaciones descritos en esta enfermedad, mismos que han permitido el diseño de modelos experimentales y cuyo estudio ha contribuido al entendimiento de los posibles mecanismos moleculares que causan la EA. Abordaremos las alteraciones celulares causadas por las proteínas mutadas en la EA y las fallas en la regulación del ciclo celular como mecanismos de la neurodegeneración en esta patología. Finalmente, describiremos algunos de los modelos



experimentales que se han empleado para el estudio de los mecanismos biológicos que subyacen a este devastador padecimiento.

### **Alteraciones genéticas en la EA**

La EA se presenta de forma familiar (heredada) o esporádica. Aproximadamente 1-6% de los pacientes presenta la enfermedad de inicio temprano, de los cuales ~60% son casos familiares. Dentro de este porcentaje ~13% tiene un modelo de herencia autosómico dominante (Campion *et al.*, 1999). La EA de inicio temprano se distingue clínicamente cuando el paciente presenta los primeros síntomas antes de los 60 años y se ha descrito una mayor susceptibilidad a padecerla cuando en la historia médica hay un familiar de primer grado afectado. La EA de origen familiar está relacionada con factores genéticos, que además parecen tener implicaciones en la severidad del padecimiento, pues se ha reportado que esta forma progresa más rápido (Liebson, 1994).

A partir del estudio de casos de EA familiar se han descrito mutaciones en tres genes involucrados en la enfermedad: la proteína precursora del amiloide (APP) en el cromosoma 21, la presenilina-1 (PS1) en el cromosoma 14 y la presenilina-2 (PS2) en el cromosoma 1. Las mutaciones en las presenilinas y APP causan una sobreproducción o falla en el procesamiento normal de la APP que se manifiestan en la acumulación del péptido  $\beta$ A. Un cuarto gen que se ha encontrado consistentemente asociado al desarrollo de la EA esporádica es el alelo  $\epsilon$ 4 del gen de apolipoproteína E (ApoE) (Selkoe, 1997).

Por otro lado, no se han encontrado factores ambientales como virus, toxinas u otros agentes que estén directamente involucrados en la patogénesis de la EA. Sin embargo, se piensa que la EA esporádica de inicio tardío, que afecta a más de 90% de los casos, se debe a la interacción de factores ambientales desconocidos con una predisposición genética (Borenstein *et al.*, 2006; Price *et al.*, 2009).

### **Mutaciones en la APP y el proceso amiloidogénico**

La APP es una proteína transmembranal que se transloca cotraduccionalmente en el retículo endoplásmico y que sigue la vía secretora hacia su localización en la membrana plasmática. La función fisiológica de la APP no se conoce con certidumbre, pero se ha reportado que puede estar involucrada en la plasticidad sináptica (Chan *et al.*, 2002).

La APP es proteolisada por secretasas denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  que liberan derivados proteicos secretados en vesículas lumenales al espacio extracelular. El resultado de la actividad secuencial de las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$  sobre la APP da lugar a la formación del péptido  $\beta$ A, una proteína de composición heterogénea que tiene un tamaño de 39 a 43 residuos. Las mutaciones conocidas en APP se relacionan con una forma autosómica dominante de la EA y correlacionan con una alteración en el procesamiento normal de APP que origina un incremento específico en los fragmentos de 42 y 43 aminoácidos, conocidos como  $\beta$ A<sub>42</sub> y  $\beta$ A<sub>43</sub> (Greenwald y Riek, 2010). La mayoría de las mutaciones descritas para esta proteína se ubican en la zona de anclaje y corte de las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$ . La mutación V717I en la APP, denominada *inglesa* por dar origen al fenotipo encontrado en una familia inglesa que presentaba problemas tempranos de memoria episódica, fue la primera en describirse y consiste en el cambio de Val por Ile en el residuo 717 que está localizado junto al dominio C-terminal del péptido  $\beta$ A (Rossor *et al.*, 1993).

Además, se sabe que otras mutaciones de la misma Val por Gly, Phe o Leu también dan origen al fenotipo (Rossor *et al.*, 1993). Posteriormente se describió otra mutación (*sueca*), identificada en dos familias suecas, que consiste en la sustitución doble de Lys/Met por Asn/Leu en las posiciones 670/671 y se ubica cerca del dominio que corresponde al sitio de anclaje y corte de la  $\beta$ -secretasa que da origen al fragmento N-terminal de la proteína  $\beta$ A (Mullan *et al.*, 1992). También se han descrito mutaciones en APP localizadas en regiones diferentes a los sitios de anclaje y corte de las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$ ; éstas incluyen las mutaciones *flamenca* A692G, *holandesa* E693Q, *ártica* E693G y *lowa* D694N. Los pacientes con estas mutaciones presentan una acumulación cerebral de  $\beta$ A, pero con un modelo de agregación diferente al encontrado en los pacientes con la EA, además de deficiencias cognitivas, demencia y, en algunos casos, hemorragia cerebral (Ryan y Rossor, 2010).

Otro tipo de alteraciones de la APP asociadas al deterioro cognitivo pueden estar relacionadas con la duplicación génica, como en el caso de los pacientes con síndrome de Down. La presencia de una copia adicional de un fragmento, o de todo el cromosoma 21, se ha asociado con la disfunción temprana y progresiva de la memoria episódica típica de la EA y con la acumulación neuropatológica de  $\beta$ A (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006).

### **Mutaciones en las presenilinas 1 y 2.**

Las mutaciones en los genes de presenilina son la causa más común de la EA familiar. Las presenilinas son proteínas transmembranales localizadas en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico. PS1 y PS2 forman parte del complejo proteico de la  $\beta$ -secretasa y se piensa que son el núcleo catalítico de dicha proteasa, pero se desconocen sus funciones normales. En el nematodo *C. elegans* se describió un gen homólogo a PS1 cuyo transcrito corresponde a la proteína sel-12 que juega un papel importante en la diferenciación celular y es considerada un inductor de la neurogénesis (Levitan y Greenwald, 1995). PS1, al igual que sel-12, puede ser un gen mediador en la vía de señalización neurogénica de lin-12/Notch (Sternberg, 1988; Sternberg y Horvitz, 1989) y en mamíferos se ha visto que ratones deficientes en PS1 presentan numerosas alteraciones en procesos somatogénicos y neurogénicos (Shen *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997).

PS1 genera fragmentos peptídicos de proteínas transmembranales que regulan la expresión génica y la estabilidad de factores de transcripción (Koo y Kopan, 2004) y tiene efectos reguladores sobre las vías de supervivencia celular y proliferación PI3K/Akt y MEK/ERK (Pimplikar *et al.*, 2010). En consecuencia, la ausencia de las presenilinas en ratones doble mutantes provoca una neurodegeneración severa dependiente de la edad (Wines-Samuelson *et al.*, 2010).

La mayoría de las mutaciones en las presenilinas asociadas con la EA familiar se han descrito para PS1. Las mutaciones por inversión de este gen afectan a 18-50% de los casos de EA familiar de inicio temprano dependiendo de la familia estudiada y hasta ahora se han descrito 176 mutaciones diferentes en aproximadamente 390 familias (Citron *et al.*, 1997). Fenotípicamente, las mutaciones en PS1 aumentan la formación de los péptidos  $\beta A_{42}$  y  $\beta A_{43}$  mediante una ganancia de función dominante que altera la actividad de las secretasas (Citron *et al.*, 1997). En contraste, las mutaciones por inversión en PS2 tienen una incidencia muy baja en la EA familiar y se han descrito diferencias en la sintomatología clínica que presentan las familias con mutaciones en PS1 y PS2. De igual manera, se ha descrito que las mutaciones en PS1 y PS2 afectan diferencialmente el corte de la  $\gamma$ -secretasa, donde las mutaciones en PS2 parecen producir una menor acumulación de  $\beta A$  (Bentahir *et al.*, 2006).

La pérdida de las presenilinas afecta también la plasticidad sináptica. Las respuestas mediadas por los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA se alteran cuando existen mutaciones en estas proteínas (Pimplikar *et al.*, 2010). Se sabe también que la pérdida de la función de las presenilinas compromete la potenciación a largo plazo y la liberación de neurotransmisores (Pimplikar *et al.*, 2010).

Las mutaciones en las presenilinas también afectan procesos fisiológicos como la autofagia, un proceso celular esencial en la supervivencia de células con ciclos de vida largos. Con la edad se presenta un declive en la eficacia de este proceso (Madeo *et al.*, 2010), lo que se ha relacionado con desórdenes lisosomales que provocan cuadros neurodegenerativos severos (Bellettato y Scarpa, 2010; Cherra *et al.*, 2010; McCray y Taylor, 2008; Nixon *et al.*, 2008). El mecanismo propuesto para esta alteración se basa en una función recién descubierta de PS1 que tiene que ver con la N-glicosilación de la subunidad VO1A en la ATPasa vacuolar (vATPasa), una bomba de protones que se encarga de acidificar el interior de los lisosomas proporcionando el pH óptimo para el funcionamiento de las enzimas lisosomales responsables de los procesos de autofagia. Cuando hay un defecto en la glicosilación de esta subunidad, la localización de la vATPasa en la membrana lisosomal se pierde (Lee *et al.*, 2010). Es posible que las mutaciones de PS1 en la EA familiar causen la pérdida de la actividad lisosómica mediante un mecanismo similar. Una de las causas de la acumulación de proteínas en la EA que llevan a la muerte neuronal puede ser una deficiencia en la degradación lisosomal de proteínas. Las fallas lisosómicas conllevan también a una distrofia neurítica relacionada con el hinchamiento de los lisosomas conteniendo fragmentos proteínicos potencialmente neurotóxicos, incluyendo  $\beta A$  (Masliah *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1997).

### **Susceptibilidad genética a la EA por mutaciones en ApoE**

La ApoE es una apolipoproteína presente en las lipoproteínas transportadoras de colesterol y lípidos. El gen de ApoE se encuentra ubicado en el cromosoma 19 y está conformado por cuatro exones que codifican para 299 aminoácidos. ApoE tiene tres alelos ( $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ ) que están definidos por polimorfismos en dos nucleótidos: rs429358 y rs7412, que codifican para tres isoformas de la proteína (ApoE1, ApoE3 y ApoE4). La isoforma más frecuente es ApoE3, que tiene Cys y Arg en las posiciones 112 y 158 respectivamente, mientras que

en estas posiciones sólo se encuentran residuos de Cys para la ApoE2 y sólo Arg en el caso de la ApoE4. Estas modificaciones alteran la estructura tridimensional de la proteína, por lo que la ApoE3 y ApoE2 se encuentran preferentemente asociadas a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), mientras que ApoE4 se asocia preferentemente a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Mahley *et al.*, 2006).

El alelo  $\epsilon 4$  es el de mayor variación entre poblaciones y se ha correlacionado con un mayor riesgo para padecer la EA esporádica. Los pacientes con EA presentan una frecuencia 2 a 3 veces mayor en este alelo, en comparación con individuos sanos. El alelo  $\epsilon 4$  se ha asociado también con la acumulación de  $\beta A$  especialmente en regiones límbicas (Schott *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha descrito un posible efecto protector del alelo  $\epsilon 2$  de ApoE, pues un aumento en la frecuencia de éste se ha relacionado con un menor riesgo de presentar la EA (Jarvik *et al.*, 1996).

Se sabe poco sobre el mecanismo tóxico implicado con las isoformas de esta apolipoproteína, pero se piensa que podría estar relacionado con la agregación patológica de  $\beta A$  (Canevari y Clark, 2007; Keller *et al.*, 2000) o con la hiperfosforilación de tau (Michikawa *et al.*, 2000).

### **Agregación anormal de proteínas como mecanismo de la neurodegeneración en la EA**

La EA forma parte de una familia de desórdenes neurodegenerativos que tiene como común denominador la acumulación anómala de agregados proteicos. Entre otros desórdenes pertenecientes a esta familia se encuentran la enfermedad de Pick y las tauopatías frontotemporales del cromosoma 17 (HFTD-17) que se generan por mutaciones en el gen que codifica la proteína tau (Spillantini y Goedert, 1998), la esclerosis lateral amiotrófica en la que hay alteraciones en los neurofilamentos y la superóxido dismutasa en algunos casos familiares (Cleveland y Rothstein, 2001), la enfermedad de Parkinson donde existe la presencia de inclusiones eosinofílicas de  $\alpha$ -sinucleína (Venda *et al.*, 2010) y la enfermedad de Huntington, que se caracteriza por la expansión de dominios de poliglutamina en la proteína huntingtina (Borrell-Pages *et al.*, 2006). Aunque no se ha determinado si la acumulación de estas proteínas es causa o consecuencia de la neurodegeneración en cada una de estas enfermedades, se sabe que dichas

alteraciones celulares son capaces de inducir la muerte neuronal a través de mecanismos que involucran la disfunción de chaperonas y del proteasoma, el organelo celular encargado de la degradación de las proteínas mal plegadas (Gao y Hu, 2008).

En la histopatología de la EA hay dos tipos de agregados proteicos: los ovillos o marañas neurofibrilares (ONFs) que se localizan en el interior de la neurona y las placas seniles ubicadas en el espacio extracelular. Los ONFs están conformados por una red compacta de filamentos helicoidales pareados (PHFs) constituidos por agregados de la proteína tau hiperfosforilada (Maccioni y Cambiazo, 1995; Selkoe, 1997). Las placas seniles son lesiones multicelulares esféricas que contienen en el centro depósitos extracelulares del péptido  $\beta A$  de 40-43 aminoácidos organizados en hojas  $\beta$ -plegadas. Este núcleo denso está rodeado por microglia, astrocitos reactivos y neuritas distróficas (Selkoe, 1997; 2001).

Las placas seniles no son exclusivas de la patología de la EA; ya en los estudios de Alois Alzheimer se sabe que estas placas se encuentran tanto en cerebros de pacientes con la enfermedad como en los controles seniles sin demencia, lo que sugería desde entonces que tales alteraciones podrían ser marcadores de senectud más que de demencia.

### **Agregación de $\beta A$ : La hipótesis de la cascada del amiloide**

Los agregados de  $\beta A$  recibieron el nombre de "amiloide" debido a su tinción característica con colorantes que tiñen el almidón. En general, las proteínas amiloides poseen un alto grado de conformación de estructura secundaria en láminas  $\beta$  plegadas. Entre estos ejemplos se encuentran la proteína amiloide del suero, la precalcitonina y la proteína de la fibra amiloide en los mielomas, relacionada con las cadenas livianas de las inmunoglobulinas (Glennner *et al.*, 1984). El péptido  $\beta A$  de 4.5 kDa es el principal componente de las placas seniles en los cerebros de los pacientes con EA familiar. La secuenciación de  $\beta A$  permitió identificarlo como un fragmento de la APP, lo que aunado al hecho de que las mutaciones en esta proteína dan origen a la EA constituye la base en la que se fundamenta la hipótesis de la cascada amiloide, que ha sido el modelo molecular de la patología de la EA más importante en los últimos años (Armstrong, 2011). La hipótesis de la cascada de amiloide considera que el incremento en el péptido  $\beta A$

se debe a la patogenicidad de las mutaciones en APP y presenilinas, y que el péptido se acumula con el progreso de la enfermedad hasta formar los agregados tóxicos que originan la formación de marañas neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada, la muerte celular y la demencia (Hardy, 2006; Hardy y Higgins, 1992). Debido a que la EA esporádica presenta un fenotipo parecido, esta hipótesis considera un mecanismo similar desencadenado por factores ambientales o de susceptibilidad genética. La hipótesis de la cascada de amiloide se puede validar a medida que se demuestre el efecto en cascada que sugiere, para lo que es necesario establecer que la acumulación de  $\beta A$  tiene una relación causal con la acumulación de tau y ésta, a su vez, con la neurodegeneración.

Los casos de EA familiar ligados a mutaciones en APP también cursan con la acumulación patológica de tau y, además, los casos de EA familiar con mutaciones en PS1 presentan más placas seniles y marañas fibrilares que los casos de EA esporádica, lo que sugiere que mutaciones en PS1 causan un incremento en la acumulación de tau (Shepherd *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha propuesto un mecanismo para explicar cómo la acumulación de  $\beta A$

origina la formación de las marañas, lo que representa un importante argumento en contra de esta hipótesis. Adicionalmente, se ha propuesto que la formación de placas seniles y marañas neurofibrilares puede ser producto de la neurodegeneración y no su causa.

Actualmente, esta hipótesis parte del envejecimiento como el principal factor de riesgo, donde adicionalmente se requiere un detonante que puede ser heredable, como las mutaciones descritas para la EA de tipo familiar, o esporádico que produzca la acumulación del péptido de  $\beta A$  (figura 1). A partir de esta acumulación patológica se puede correlacionar el tipo y grado de agregación del péptido con diferentes eventos patológicos que desenlazan en la neurodegeneración y la demencia.

### Alteraciones de la proteína tau

En condiciones normales, la proteína tau juega un papel fundamental en la modulación de la formación de los microtúbulos. Sin embargo, una alteración en las señales reguladoras mediante un mecanismo aún desconocido disocia a la proteína tau de los microtúbulos, formando agregados intracelulares y produciendo una disfunción

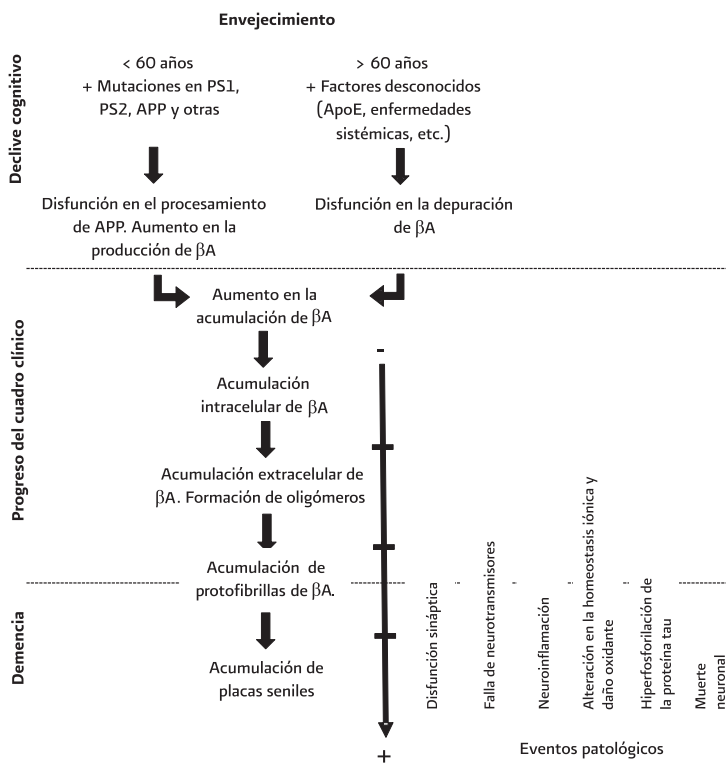


Figura 1. Hipótesis en cascada del amiloide. Este esquema integra la hipótesis de la acumulación del péptido  $\beta A$  como el origen de la EA con el progreso de eventos patológicos ligados a la evolución del cuadro clínico, considerando al envejecimiento como el principal factor de riesgo.

neuronal (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Kosik *et al.*, 1986). Cuando existen alteraciones postraduccionales en esta proteína se generan los ONFs, que se encuentran preferentemente en los cuerpos neuronales y dendritas apicales y en menor proporción en las dendritas distales, los filamentos del neuropilo y en neuritas distróficas que rodean los núcleos centrales de algunas placas amiloides y que constituyen la principal lesión intracelular (Stoothoff y Johnson, 2005).

Un evento molecular determinante en la patogénesis de la EA es la formación de los PHFs. La presencia de otras alteraciones, como los depósitos del péptido  $\beta$ A, no es suficiente para causar la EA (Takashima *et al.*, 1993). La formación de placas seniles es común en el envejecimiento normal, encontrándose rara vez ovillos sin la presencia de placas, por lo que se ha planteado que el depósito de  $\beta$ A precede a la formación de ONFs (Maccioni *et al.*, 2001a, 2001b). Sin embargo, es posible que la formación de PHFs y placas seniles produzcan en forma complementaria la pérdida de la actividad de las neuronas afectadas (Gonzalez *et al.*, 1998; Maccioni *et al.*, 2001a).

### **Alteraciones del ciclo celular como un mecanismo de neurodegeneración en la EA**

Recientemente se ha involucrado en la etiología de la EA a procesos alterados en el control del ciclo celular. Aunque normalmente las neuronas se encuentran en el estadio G0 del ciclo, retienen la habilidad de reactivarlo en respuesta a daños en el sistema nervioso. Se ha demostrado que alteraciones del control del ciclo celular que causan una reentrada al ciclo en las células posmitóticas promueven la muerte celular en lugar de la proliferación (Wang *et al.*, 2009), y que los cambios en los controladores del ciclo celular generalmente preceden a la muerte neuronal (Busser *et al.*, 1998). En estos casos, la mitosis no se completa ya que no hay evidencia de la condensación de la cromatina ni de la formación de los husos mitóticos, dos procesos indispensables para la progresión a la fase M (Vincent *et al.*, 1997).

En cerebros de pacientes con EA se han encontrado niveles anormalmente elevados de algunos factores que controlan la progresión del ciclo celular, como las cinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK5 y sus factores reguladores p16 y p25, respectivamente (Arendt *et al.*,

1996; McShea *et al.*, 1997). En el caso CDK5, una cinasa que juega un papel importante en la fisiología neuronal (Dhavan y Tsai, 2001), se sabe que se activa al asociarse a p35 o p39. Una activación aberrante de CDK5 ocurre cuando p35 es convertido a p25 por medio de la calpaína, una proteasa dependiente de calcio (Kusakawa *et al.*, 2000), o por la acción del péptido  $\beta$ A (Lee *et al.*, 2000). Se sabe que la actividad de CDK5 está aumentada en cerebros de pacientes con EA en donde también se ha encontrado una presencia elevada de p25 (Patrick *et al.*, 1999). Este activador también está aumentado en modelos murinos de la EA (Oakley *et al.*, 2006). Interesantemente, ratones transgénicos que sobreexpresan p25 presentan concentraciones elevadas de  $\beta$ A42 en el cerebro (Cruz *et al.*, 2003; Fisher y Sloutsky, 2005; Kim *et al.*, 2008); si CDK5 se inactiva en estos ratones, la producción de  $\beta$ A42 disminuye (Wen *et al.*, 2008).

Otro vínculo entre la elevación en la expresión de los controladores del ciclo celular y la muerte de las neuronas en la EA se encuentra en la acción tóxica de la proteína tau que puede ser hiperfosforilada por las enzimas que dirigen el progreso del ciclo celular (Dranovsky *et al.*, 2001; Husseman *et al.*, 2000). Este mecanismo podría estar mediado por el péptido  $\beta$ A, que induce alteraciones en la vía de señalización de CDK5 activada por p35 y p39 (Alvarez *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 1999). Otros marcadores de alteraciones del ciclo celular en la EA incluyen neuronas con genomas tetraploides; estas neuronas reentran al ciclo y terminan la fase S pero no continúan más allá y se detienen en la fase M (Yang *et al.*, 2001).

### **Modelos de estudio de la EA**

El desarrollo de los modelos experimentales animales que reproduzcan tanto las características histopatológicas como las conductuales de la enfermedad humana se ha enfocado en dos estrategias: la administración exógena de agentes neurotóxicos que mimetizan las lesiones típicas de la EA y el desarrollo de modelos transgénicos.

### **Infusión intracerebral de $\beta$ A**

Algunas de las características de la enfermedad pueden ser modeladas mediante la administración intracerebral de los péptidos  $\beta$ A<sub>42</sub> y/o  $\beta$ A<sub>43</sub> en ratones, ratas e incluso en primates. Mediante este tipo de aproximaciones

experimentales se han descrito algunos de los efectos tóxicos del péptido  $\beta$ A en estado soluble o en estados intermedios de agregación. Por ejemplo, la administración intracerebroventricular de este péptido resulta en un déficit en el aprendizaje en roedores viejos, mas no en jóvenes, que es independiente de la agregación del mismo y del proceso de inflamación que la acompaña (Malm *et al.*, 2006). También se ha reportado el efecto de  $\beta$ A sobre los sistemas de neurotransmisión colinérgico y glutamatérgico y se ha descrito que este péptido es capaz de alterar la actividad de la colin-acetiltransferasa, interactuar con los receptores nicotínicos para acetilcolina y modificar en general los procesos de aprendizaje y memoria (Tran *et al.*, 2002).

Se ha descrito que la inyección intracerebral directamente en el hipocampo y la corteza somatosensorial de un extracto celular rico en  $\beta$ A obtenido de ratones transgénicos de APP induce la acumulación de tau, lo que apoya la hipótesis que sostiene que  $\beta$ A es una molécula activadora de la patología mediada por tau (Bolmont *et al.*, 2007). La administración conjunta de  $\beta$ A y tiorfan, un inhibidor de la remoción de  $\beta$ A, causa en primates de mediana edad un aumento significativo en la acumulación intracelular de  $\beta$ A en neuronas de los ganglios basales, la corteza y el hipocampo, lo que va acompañado de atrofia y muerte neuronal (Li *et al.*, 2010). Este tipo de estrategias experimentales también ha permitido ensayar el efecto terapéutico de algunos fármacos; por ejemplo, la administración de T-817MA reduce las deficiencias cognitivas debidas a la neurodegeneración causada por la infusión del péptido (Kimura *et al.*, 2009).

### **Modelos transgénicos**

Los primeros modelos transgénicos para la EA están basados en las mutaciones descritas para la EA familiar, a pesar de que éstas afectan sólo a un pequeño porcentaje de los casos. Muchas de las proteínas mutadas se han expresado en organismos invertebrados como *C. elegans* y *D. melanogaster* (Link, 2005). Los estudios en estas especies comenzaron con la identificación de los genes homólogos a APP, presenilinas, tau y ApoE para investigar el efecto de las deleciones correspondientes. Se demostró que el gen de APP en moscas (Rosen *et al.*, 1989) y en gusanos (Daigle y Li, 1993) carece de la secuencia que codifica para  $\beta$ A. La deleción del gen homólogo de APP en moscas no produjo alteraciones fenotípicas, pero

su sobreexpresión causó deficiencias en el proceso de eclosión embrionaria (Torroja *et al.*, 1999). En el caso de las presenilinas, los gusanos poseen dos genes homólogos para PS1 y PS2: sel-12, mientras que las moscas sólo uno: spe-4 (Link, 2005). Como mencionamos anteriormente, se ha descrito que sel-12 participa en la vía de señalización Notch. Las alteraciones causadas por la deleción de sel-12 en *C. elegans* pueden ser rescatadas al insertar los genes funcionales de presenilina humanos (Baumeister *et al.*, 1997).

En mamíferos, muchos de los estudios se han enfocado al desarrollo de roedores transgénicos que en su mayoría sobreexpresan alguna mutación en la APP en combinación con mutaciones presenilinas. Además se han descrito modelos transgénicos basados en alteraciones relacionadas con la proteína tau y la combinación de ambas estrategias. Uno de los primeros modelos generados en ratón emplea el promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que está altamente expresado en el sistema nervioso central, para dirigir la transcripción de un transgen humano con la mutación V717F en la APP. La línea generada se identifica como PDAPP, haciendo referencia a la combinación del promotor y la mutación en la APP (Games *et al.*, 1995; Masliah *et al.*, 1996).

En este modelo existe una mayor expresión del ARN mensajero que codifica para la APP humana mutada en relación con la APP silvestre del ratón (Rockenstein *et al.*, 1995), provocando la formación de placas de  $\beta$ A, neuritis distróficas, pérdida de las terminales presinápticas y activación de astrocitos y microglia, que correlacionan con un deterioro de la memoria en tareas espaciales y con problemas cognitivos en tareas asociativas a partir de los 6 meses de edad (Gerlai *et al.*, 2002; Morgan, 2003).

También se han generado otros modelos que, de manera semejante, expresan una mutación humana en la APP bajo el control de otros promotores como el de la proteína prion (PrP) (Borchelt *et al.*, 1997; Hsiao *et al.*, 1996) o Thy1 (Andra *et al.*, 1996; Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997).

En estos modelos, la acumulación de  $\beta$ A comienza a los 12 meses de edad pero la coexpresión de una mutación en PS1 acelera la acumulación de  $\beta$ A desde los 4 meses (Borchelt *et al.*, 1997). Se han reportado diferencias en cuanto al tipo y tiempo de la acumulación de  $\beta$ A en

función del promotor usado en cada modelo; así, mientras la expresión de la APP humana bajo el promotor de PDGF resulta en la formación de placas difusas (Games *et al.*, 1995), las mutaciones controladas por los promotores Thy1 y PrP favorecen la formación de placas seniles maduras tanto en la corteza como en el hipocampo (Andra *et al.*, 1996; Hsiao *et al.*, 1996).

Además de los modelos que acumulan  $\beta$ A en placas seniles, se han desarrollado otros que favorecen su acumulación intracelular. Uno de ellos fue desarrollado en ratas transgénicas que expresan una mutación humana en la APP (hAPP751) en combinación con una mutación en PS1 (M146L) bajo el promotor de PDGF (Echeverria *et al.*, 2004). Estas ratas presentan una fuerte acumulación de  $\beta$ A intracelular y, a partir de los 15-18 meses, desarrollan depósitos extracelulares, mientras que otro modelo transgénico en ratas que expresan mutaciones en la APP en combinación con la mutación M146V en PS1 bajo el promotor de sinapsina-1, desarrolla placas seniles desde los 7 meses de edad (Flood *et al.*, 2009). También se han diseñado modelos transgénicos con la finalidad de reproducir la patología inducida por la proteína tau. El ratón transgénico con la mutación P301S en tau desarrolla la acumulación de ONFs en la médula espinal, el cerebelo y el cerebro anterior, lo que genera deficiencias motoras y muerte neuronal en la médula espinal. La presencia de ONFs en este ratón correlaciona con un desempeño pobre en el laberinto acuático de Morris (Ramsden *et al.*, 2005). Por otro lado, el ratón rTg 4510 expresa la mutación P301L de tau que está asociada a la demencia frontotemporal. Dicho modelo también presenta la formación de ONFs en regiones cerebrales relevantes en la EA (corteza e hipocampo), además de un declive cognitivo temprano a partir de los 4 meses de edad y neurodegeneración (Gotz *et al.*, 2001).

Un modelo en ratones que de manera muy interesante desarrolla acumulación intracelular y extracelular de  $\beta$ A, además de acumulación patológica de la proteína tau, es el denominado triple transgénico de la EA (3xTg-AD). Este modelo tiene la mutación sueca de APP, la mutación P301L de tau y la mutación M146V de PS1. El modelo se realizó introduciendo directamente dos transgenes humanos (APP<sup>swe</sup> y tau<sup>P310L</sup>) adicionales a una línea germinal de ratones modificados genéticamente con una mutación en el gen de PS1. Ambos genes insertados

están bajo el control del promotor de Thy1, que permite que los genes se expresen sólo en el sistema nervioso del ratón (LaFerla *et al.*, 2007). En el modelo 3xTg-AD, los depósitos en placas del péptido  $\beta$ A y de marañas de tau se desarrollan en regiones cerebrales de relevancia en la EA humana y, además, se acumulan a través del tiempo. Estos ratones comienzan a presentar deficiencias en procesos de memoria y aprendizaje a partir de los 6 meses de edad, causadas por la acumulación de  $\beta$ A intraneuronal, sin que se observen aún alteraciones estructurales en las neuronas. A medida que progresa la enfermedad, la acumulación de placas seniles y de marañas neurofibrilares provoca cambios estructurales que potencian el déficit cognitivo.

El modelo 3xTg-AD es el primer modelo animal que desarrolla placas y neurofibrillas; además, lo hace de manera progresiva. Estos ratones muestran déficits en la plasticidad sináptica antes de que se observen las placas y las neurofibrillas en las células cerebrales, por lo cual es muy similar al desarrollo de la enfermedad en humanos (Oddo *et al.*, 2003a; Oddo *et al.*, 2003b). Ningún modelo animal reproduce por completo la enfermedad del humano, pero sí contribuyen a la generación de información, lo que ha permitido identificar algunos de los mecanismos mediados por el péptido  $\beta$ A en la generación de la fisiopatología de la EA, y han servido en pruebas preclínicas de agentes con potencial terapéutico.

A pesar de la gran cantidad de información que se tiene actualmente sobre los posibles mecanismos celulares y moleculares involucrados en la patología de la EA, aún no se conoce con certidumbre de que manera éstos promueven la neurodegeneración y las alteraciones fisiopatológicas presentes en esta enfermedad. Existe, además, una gran diversidad de variables y síndromes similares que sugieren que los mecanismos implicados en este proceso son heterogéneos, por lo que el entendimiento de las interacciones entre todos estos factores resultará de gran relevancia para la comprensión de la patología y el desarrollo de terapias efectivas.

Algunas pruebas clínicas permiten evaluar las mutaciones en los genes implicados en la EA de tipo familiar e identificar los alelos relacionados con la susceptibilidad a la EA esporádica. Sin embargo, las pruebas genéticas

deben ser usadas como una herramienta predictiva y no de diagnóstico, pues conclusiones equivocadas debido a una interpretación sesgada o errada pueden acarrear consecuencias serias en el estado emocional de los individuos y en sus familias. Por otro lado, a pesar de que la evidencia genética disponible aún no permite obtener un diagnóstico temprano para el estudio de terapias, es innegable la importancia de esta información para el desarrollo de nuevas hipótesis y modelos que permitan entender los mecanismos que subyacen a la enfermedad. Dado el fenómeno de envejecimiento poblacional que está ocurriendo en México y en el mundo, el estudio de las enfermedades crónico-degenerativas que afectan principalmente a los adultos mayores adquiere una gran relevancia en diferentes ámbitos, incluyendo a la investigación biomédica básica.

1. Alvarez A, Munoz JP y Maccioni RB. A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res*, 2001;264:266-274.
2. Alvarez A, Toro R, Caceres A, et al. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett*, 1999;459:421-426.
3. Andra K, Abramowski D, Duke M, et al. Expression of APP in transgenic mice: a comparison of neuron-specific promoters. *Neurobiol Aging*, 1996;17:183-190.
4. Arendt T, Rodel L, Gartner U, et al. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 1996;7:3047-3049.
5. Armstrong RA. The pathogenesis of Alzheimer's disease: a reevaluation of the "amyloid cascade hypothesis". *Int J Alzheimers Dis*, 2011;2011:630865.
6. Baumeister R, Leimer U, Zweckbronner I, et al. Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate *Caenorhabditis elegans* Notch signalling independently of proteolytic processing. *Genes Funct*, 1997;1:149-159.
7. Bellettato CM y Scarpa M. Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*, 2010;33:347-362.
8. Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, et al. Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem*, 2006;96:732-742.
9. Bolmont T, Clavaguera F, Meyer-Luehmann M, et al. Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am J Pathol*, 2007;171:2012-2020.
10. Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, et al. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, 1997;19:939-945.
11. Borenstein AR, Copenhagen CI y Mortimer JA. Early-life risk factors for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2006;20:63-72.
12. Borrell-Pages M, Zala D, Humbert S, et al. Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci*, 2006;63:2642-2660.
13. Busser J, Geldmacher DS y Herrup K. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci*, 1998;18:2801-2807.
14. Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet*, 1999;65:664-670.
15. Canevari L y Clark JB. Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection. *Neurochem Res*, 2007;32:739-750.
16. Citron M, Westaway D, Xia W, et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med*, 1997;3:67-72.
17. Cleveland DW y Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*, 2001;2:806-819.
18. Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, et al. Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron*, 2003;40:471-483.
19. Chan SL, Furukawa K y Mattson MP. Presenilins and APP in neuritic and synaptic plasticity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 2002;2:167-196.
20. Cherra SJ, 3rd, Dagda RK y Chu CT. Review: autophagy and neurodegeneration: survival at a cost?



- Neuropathol Appl Neurobiol, 2010;36:125-132.
21. Chouinard J. Dysphagia in Alzheimer disease: a review. *J Nutr Health Aging*, 2000;4:214-217.
  22. Daigle I y Li C. *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993;90:12045-12049.
  23. Dhavan R y Tsai LH. A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001;2:749-759.
  24. Dranovsky A, Vincent I, Gregori L, et al. Cdc2 phosphorylation of nucleolin demarcates mitotic stages and Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging*, 2001;22:517-528.
  25. Echeverria V, Ducatenzeiler A, Alhonen L, et al. Rat transgenic models with a phenotype of intracellular Abeta accumulation in hippocampus and cortex. *J Alzheimers Dis*, 2004;6:209-219.
  26. Fisher AV y Sloutsky VM. When induction meets memory: evidence for gradual transition from similarity-based to category-based induction. *Child Dev*, 2005;76:583-597.
  27. Flood DG, Lin YG, Lang DM, et al. A transgenic rat model of Alzheimer's disease with extracellular Abeta deposition. *Neurobiol Aging*, 2009;30:1078-1090.
  28. Games D, Adams D, Alessandrini R, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 1995;373:523-527.
  29. Gao X y Hu H. Quality control of the proteins associated with neurodegenerative diseases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008;40:612-618.
  30. Gerlai R, Fitch T, Bales KR, et al. Behavioral impairment of APP(V717F) mice in fear conditioning: is it only cognition? *Behav Brain Res*, 2002;136:503-509.
  31. Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, et al. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol*, 1984;2:357-369.
  32. Gonzalez C, Farias G y Maccioni RB. Modification of tau to an Alzheimer's type protein interferes with its interaction with microtubules. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1998;44:1117-1127.
  33. Gotz J, Chen F, Barmettler R, et al. Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem*, 2001;276:529-534.
  34. Greenwald J y Riek R. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure*, 2010;18:1244-1260.
  35. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, et al. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*, 1986;261:6084-6089.
  36. Hardy J. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. *J Alzheimers Dis*, 2006;9:151-153.
  37. Hardy JA y Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 1992;256:184-185.
  38. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 1996;274:99-102.
  39. Husseman JW, Nochlin D y Vincent I. Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*, 2000;21:815-828.
  40. Jarvik G, Larson EB, Goddard K, et al. Influence of apolipoprotein E genotype on the transmission of Alzheimer disease in a community-based sample. *Am J Hum Genet*, 1996;58:191-200.
  41. Keller JN, Lauderback CM, Butterfield DA, et al. Amyloid beta-peptide effects on synaptosomes from apolipoprotein E-deficient mice. *J Neurochem*, 2000;74:1579-1586.
  42. Kim D, Frank CL, Dobbin MM, et al. Dereglulation of HDAC1 by p25/Cdk5 in neurotoxicity. *Neuron*, 2008;60:803-817.
  43. Kimura T, Hong Nguyen PT, Ho SA, et al. T-817MA, a neurotrophic agent, ameliorates the deficits in adult neurogenesis and spatial memory in rats infused i.c.v. with amyloid-beta peptide. *Br J Pharmacol*, 2009;157:451-463.
  44. Koo EH y Kopan R. Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration. *Nat Med*, 2004;10 Suppl:S26-33.
  45. Kosik KS, Joachim CL y Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau ( $\tau$ ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986;83:4044-4048.
  46. Kusakawa G, Saito T, Onuki R, et al. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem*, 2000;275:17166-17172.

47. LaFerla FM, Green KN y Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2007;8:499-509.
48. Lee JH, Yu WH, Kumar A, et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 2010;141:1146-1158.
49. Lee MS, Kwon YT, Li M, et al. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*, 2000;405:360-364.
50. Levitan D y Greenwald I. Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature*, 1995;377:351-354.
51. Li W, Wu Y, Min F, et al. A nonhuman primate model of Alzheimer's disease generated by intracranial injection of amyloid-beta42 and thiorphan. *Metab Brain Dis*, 2010;25:277-284.
52. Liebson E AM. Cognitive changes in dementia of the Alzheimer type. Philadelphia: Saunders WB 1994.
53. Link CD. Invertebrate models of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav*, 2005;4:147-156.
54. Maccioni RB y Cambiazo V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev*, 1995;75:835-864.
55. Maccioni RB, Munoz JP y Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res*, 2001a;32:367-381.
56. Maccioni RB, Otth C, Concha, II, et al. The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem*, 2001b;268:1518-1527.
57. Madeo F, Tavernarakis N y Kroemer G. Can autophagy promote longevity? *Nat Cell Biol*, 2010;12:842-846.
58. Mahley RW, Weisgraber KH y Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006;103:5644-5651.
59. Malm T, Ort M, Tahtivaara L, et al. beta-Amyloid infusion results in delayed and age-dependent learning deficits without role of inflammation or beta-amyloid deposits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006;103:8852-8857.
60. Masliah E, Mallory M, Deerinck T, et al. Re-evaluation of the structural organization of neuritic plaques in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1993;52:619-632.
61. Masliah E, Sisk A, Mallory M, et al. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 1996;16:5795-5811.
62. McCray BA y Taylor JP. The role of autophagy in age-related neurodegeneration. *Neurosignals*, 2008;16:75-84.
63. McShea A, Harris PL, Webster KR, et al. Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 1997;150:1933-1939.
64. Michikawa M, Fan QW, Isobe I, et al. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem*, 2000;74:1008-1016.
65. Morgan D. Learning and memory deficits in APP transgenic mouse models of amyloid deposition. *Neurochem Res*, 2003;28:1029-1034.
66. Mullan M, Crawford F, Axelman K, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*, 1992;1:345-347.
67. Nixon RA, Yang DS y Lee JH. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy*, 2008;4:590-599.
68. Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, 2006;26:10129-10140.
69. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, et al. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2003a;24:1063-1070.
70. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 2003b;39:409-421.
71. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, et al. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*, 1999;402:615-622.
72. Pimplikar SW, Nixon RA, Robakis NK, et al. Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci*, 2010;30:14946-14954.
73. Price JL, McKeel DW, Jr., Buckles VD, et al. Neuropathology of nondemented aging: presumptive

- evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, 2009;30:1026-1036.
74. Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, et al. Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci*, 2005;25:10637-10647.
  75. Rockenstein EM, McConlogue L, Tan H, et al. Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 1995;270:28257-28267.
  76. Rosen DR, Martin-Morris L, Luo LQ, et al. A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989;86:2478-2482.
  77. Rossor MN, Newman S, Frackowiak RS, et al. Alzheimer's disease families with amyloid precursor protein mutations. *Ann N Y Acad Sci*, 1993;695:198-202.
  78. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*, 2006;38:24-26.
  79. Ryan NS y Rossor MN. Correlating familial Alzheimer's disease gene mutations with clinical phenotype. *Biomark Med*, 2010;4:99-112.
  80. Schott JM, Ridha BH, Crutch SJ, et al. Apolipoprotein e genotype modifies the phenotype of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2006;63:155-156.
  81. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science*, 1997;275:630-631.
  82. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 2001;81:741-766.
  83. Shen J, Bronson RT, Chen DF, et al. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell*, 1997;89:629-639.
  84. Shepherd CE, Gregory GC, Vickers JC, et al. Positional effects of presenilin-1 mutations on tau phosphorylation in cortical plaques. *Neurobiology of disease*, 2004;15:115-119.
  85. Spillantini MG y Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, 1998;21:428-433.
  86. Sternberg PW. Lateral inhibition during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1988;335:551-554.
  87. Sternberg PW y Horvitz HR. The combined action of two intercellular signaling pathways specifies three cell fates during vulval induction in *C. elegans*. *Cell*, 1989;58:679-693.
  88. Stoothoff WH y Johnson GV. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta*, 2005;1739:280-297.
  89. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997;94:13287-13292.
  90. Suzuki K, Kuwahara A, Nishikiori T, et al. NF00659A1, A2, A3, B1 and B2, novel antitumor antibiotics produced by *Aspergillus* sp. NF 00659. II. Structural elucidation. *J Antibiot (Tokyo)*, 1997;50:318-324.
  91. Takashima A, Noguchi K, Sato K, et al. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993;90:7789-7793.
  92. Todd E. Feinberg MJF. Behavioral neurology and neuropsychology. Second edition ed: McGraw-Hill; 2003.
  93. Torroja L, Chu H, Kotovsky I, et al. Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr Biol*, 1999;9:489-492.
  94. Tran MH, Yamada K y Nabeshima T. Amyloid beta-peptide induces cholinergic dysfunction and cognitive deficits: a minireview. *Peptides*, 2002;23:1271-1283.
  95. Venda LL, Cragg SJ, Buchman VL, et al. alpha-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 2010;33:559-568.
  96. Vincent I, Jicha G, Rosado M, et al. Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J Neurosci*, 1997;17:3588-3598.
  97. Wang W, Bu B, Xie M, et al. Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Prog Neurobiol*, 2009;89:1-17.
  98. Wen Y, Yu WH, Maloney B, et al. Transcriptional regulation of beta-secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing. *Neuron*, 2008;57:680-690.
  99. West MJ. Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging*, 1993;14:287-293.
  100. Wines-Samuelson M, Schulte EC, Smith MJ, et

al. Characterization of age-dependent and progressive cortical neuronal degeneration in presenilin conditional mutant mice. *PLoS One*, 2010;5:e10195.

101. Wong PC, Zheng H, Chen H, et al. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature*, 1997;387:288-292.

102. Yang Y, Geldmacher DS y Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2001;21:2661-2668.

### **Perla Moreno Castilla**

Estudió la licenciatura en Química Farmacéutico Biológica y la maestría en Ingeniería en la Facultad de Química de la UNAM. Es profesora de asignatura en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y en la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Forma parte del personal académico del Departamento de Neurociencias Cognitivas del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Trabaja en el laboratorio de aprendizaje y memoria, donde estudia los trastornos de la transmisión neuroquímica durante el deterioro cognitivo en un modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer.

### **Luis B. Tovar y Romo**

Licenciado en Investigación Biomédica Básica y doctor en Ciencias por la Universidad Nacional Autónoma de México. Especialista en mecanismos celulares y moleculares de la muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas. Ha trabajado en laboratorios de investigación básica en los institutos de Investigaciones Biomédicas y de Fisiología Celular de la UNAM, en el Instituto de Biología del Desarrollo de Marsella Luminy, del Instituto Nacional de Salud e Investigación Médica de Francia, y en el Departamento de Neurología de la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins en Estados Unidos. Ha sido investigador en Ciencias Médicas del Instituto de Geriatria y profesor de asignatura de la Facultad de Medicina de la UNAM. Actualmente es investigador postdoctoral en Johns Hopkins.

**Perla Moreno Castilla**

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología  
Celular, Universidad Nacional Autónoma de  
México.

perlamc@ifc.unam.mx

**Luis Bernardo Tovar y Romo**

Department of Neurology, The Johns Hopkins  
University School of Medicine.

ltovary1@jhmi.edu

a enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer y uno de los más antiguos padecimientos crónico-degenerativos de los que se tienen registros. En el sistema de medicina tradicional de India se le conocía como *Kampavata* y una de las primeras referencias de este padecimiento en la medicina occidental fue hecha por Galeno, quien le dio el nombre de “parálisis agitante”. No obstante, fue el médico británico James Parkinson quien, con base en observaciones clínicas realizadas por él mismo en seis pacientes, publicó en 1817 un ensayo con la primera descripción sistemática e integral sobre la parálisis agitante. El nombre de “enfermedad de Parkinson” le fue dado por Jean Martin Charcot, un célebre neurofisiólogo francés que, entre otras aportaciones a la medicina, describió por primera vez la esclerosis lateral amiotrófica.

La EP ocurre en la adultez media-mayor, generalmente entre los 50 y 80 años de edad, y su frecuencia muestra el nivel más alto entre los 65 y 75 años; la incidencia se reduce significativamente después de los 80 años. Esta enfermedad afecta a 1% de la población mayor de 65 años y las manifestaciones sintomatológicas más prominentes son lentitud en los movimientos voluntarios (bradicinecia), temblor en reposo, rigidez, anormalidades en la marcha e inestabilidad postural (Thomas y Beal, 2007). El origen de la EP es la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* que proveen la innervación dopaminérgica del estriado, aunque la muerte neuronal también ocurre en menor medida en núcleos catecolaminérgicos y serotoninérgicos en el tallo cerebral, el hipotálamo, algunas regiones de la corteza (neuronas corticales pequeñas) y en el núcleo basalis de Meynert (Beal, 2001). Histopatológicamente, la EP se caracteriza por la presencia de inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en las neuronas sobrevivientes llamadas cuerpos de Lewy. Estos cuerpos están constituidos por un centro granular denso rodeado de un halo filamentoso y se caracterizan por un alto contenido de  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina, que pueden estar en los somas o en las dendritas neuronales.

Aunque la EP se presenta típicamente en edades avanzadas, existen también formas juveniles. De acuerdo

con la edad de inicio de los síntomas, es posible distinguir la EP juvenil, cuyos primeros síntomas se presentan antes de los 20 años; la EP de inicio temprano presenta síntomas antes de los 50 años y la EP de inicio tardío, en la mayoría de los casos idiopática, se manifiesta después de los 50 años de edad (Pankratz *et al.*, 1993). Las formas juveniles están ligadas a factores ambientales como la exposición a toxinas y a mutaciones.

En este capítulo mencionaremos las alteraciones genéticas que dan origen a la EP familiar y algunos de los mecanismos moleculares que pueden estar involucrados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra*. Revisaremos también los rasgos principales de la transmisión sináptica dopaminérgica y describiremos el circuito motor de los ganglios basales que es afectado por la pérdida de la dopamina en el estriado. Finalmente, mencionaremos algunos de los modelos experimentales que se han desarrollado para el estudio de la EP.

### **Alteraciones genéticas como causa de la EP**

El origen de la muerte neuronal en la EP es desconocido, pero aproximadamente 10% de los casos es ocasionado por alteraciones genéticas que siguen un modelo de herencia mendeliano. Se han ligado mutaciones en 6 genes diferentes a formas monogénicas de parkinsonismo; no obstante, los mecanismos moleculares por los cuales las alteraciones en estos genes causan la enfermedad no se tienen bien entendidos, así como tampoco se conoce mucho acerca de las funciones fisiológicas de la mayoría de ellos.

Entre los genes mutados se encuentra la  $\alpha$ -sinucleína presente en los cuerpos de Lewy. Aunque no se conoce con precisión la función fisiológica de esta proteína, se sospecha que puede estar involucrada en el almacenamiento y la compartimentación de neurotransmisores, así como en el reciclaje de vesículas sinápticas (Yavich *et al.*, 2006; Yavich *et al.*, 2004). Los ratones *knockout* de  $\alpha$ -sinucleína son viables, fértiles y no tienen alteraciones funcionales del cerebro, por lo que las mutaciones en esta proteína deben causar la patología a través de un mecanismo de ganancia de función (Abeliovich *et al.*, 2000).

Otras alteraciones genéticas involucradas en la EP incluyen los genes parkin, DJ-1, PINK1, LRRK2 y ATP13A2. Parkin codifica una proteína con un dominio

N-terminal parecido a ubiquitina y que tiene la función de ubiquitina ligasa para la degradación de proteínas blanco en el proteasoma (Shimura *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000); la pérdida de la actividad catalítica de esta proteína debida a mutaciones origina una forma temprana de la EP (Kitada *et al.*, 1998). A DJ-1 se le han atribuido funciones de antioxidante, coactivador transcripcional y chaperona, y la pérdida de su función ha sido asociada con un parkinsonismo de origen temprano (Bonifati *et al.*, 2003). PINK1 codifica para una proteína mitocondrial cuya función exacta aún no se ha dilucidado, pero se sabe que las mutaciones en este gen ocasionan una serie de alteraciones mitocondriales que eventualmente conducen a las neuronas a la muerte apoptótica (Petit *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2004). Tampoco se conoce la función de LRRK2, pero se sabe que tiene dominios con homologías a GTPasas y MAPKKK (proteínas reguladoras de vías de señalamiento intracelular) y se ha encontrado mutada en casos familiares y esporádicos de la EP (Thomas y Beal, 2007). Finalmente, ATP13A2 es una proteína de la membrana lisosomal con un dominio de ATPasa que se ha encontrado alterada en algunas familias con parkinsonismo (Najim al-Din *et al.*, 1994; Ramirez *et al.*, 2006). De los genes anteriormente mencionados,  $\alpha$ -sinucleína y LRRK2 transmiten la enfermedad con un modelo de herencia autosómico dominante y el resto de ellos lo hacen de manera recesiva.

### El envejecimiento y la enfermedad de Parkinson

El envejecimiento es un factor de riesgo para el desarrollo de la EP, sin embargo, el hecho de que la incidencia disminuya al superar los 80 años involucra que, a diferencia de lo que sucede en la enfermedad de Alzheimer, no es un factor que esté directamente asociado a la presentación de la misma. Aun así, cabe considerar que durante el envejecimiento ocurren una serie de alteraciones bioquímicas, morfológicas y funcionales que incrementan el riesgo de padecer la enfermedad; por ejemplo, se sabe que el envejecimiento involucra una pérdida significativa de neuronas de la sustancia *nigra* (Stark y Pakkenberg, 2004). Aunque existe una discusión sobre el grado de alteraciones más finas que ocurren en los cerebros envejecidos en cuanto al volumen de los somas o la morfología de los procesos neuronales (Eriksen *et al.*, 2009). Sin embargo, la pérdida neuronal en la vejez tiene cierto grado de compensación; por ejemplo, se ha demostrado que las neuronas sobrevivientes

de la sustancia *nigra pars compacta* tienen un nivel incrementado de síntesis de tirosina hidroxilasa, la enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de dopamina (Greenwood *et al.*, 1991), así como hipertrofia de las neuronas pigmentosas de la sustancia *nigra* (Rudow *et al.*, 2008).

### Transmisión sináptica dopaminérgica

La dopamina es un neurotransmisor que pertenece a la familia de las catecolaminas por poseer en su estructura un grupo catecol (anillo de benceno con dos sustituyentes hidroxilo y un grupo amino) y está involucrada en un número importante de procesos cerebrales como el control de los movimientos, el sistema límbico de recompensa y procesos cognitivos. La concentración de dopamina en el cerebro debe mantener un estado dinámico que se regula por la tasa de síntesis y degradación de la misma. La enzima que limita la biosíntesis de la dopamina y de otras catecolaminas es la tirosina hidroxilasa (TH), que cataliza la adición de un grupo hidroxilo en la posición meta de la tirosina, formando el compuesto dihidroxifenilalanina, también conocido como dopa (figura 1). La TH, también denominada tirosina 3-monooxigenasa, pertenece a la familia de hidroxilasas de aminoácidos aromáticos que utilizan tetrahidrobiopterina como coenzima y hierro (II) no unido a un grupo hemo como cofactor (Haavik y Toska, 1998)

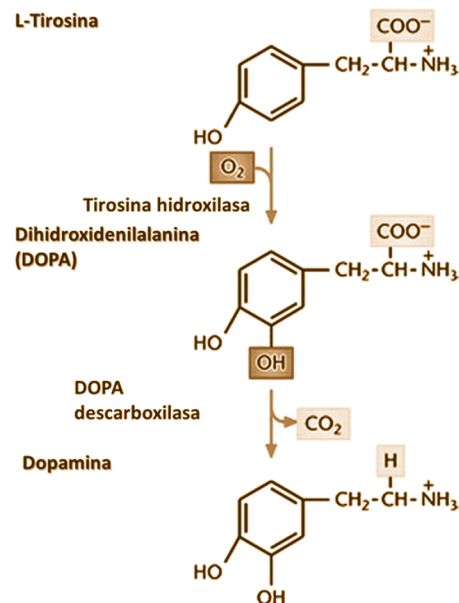


Figura 1. Biosíntesis de dopamina.

El gen de la TH en humanos está conformado por 14 exones y 13 intrones que al ser traducidos dan origen a 4 isoformas de la enzima (Goldstein y Lieberman, 1992). La TH es un homotetrámero formado por unidades de 60 kDa; cada subunidad posee un dominio catalítico y uno regulador; el dominio catalítico que corresponde al extremo C-terminal es el más conservado en la evolución y es donde interactúan la coenzima y el sustrato durante la catálisis. La TH tiene una actividad finamente regulada por la concentración de su cofactor y de las catecolaminas y por el estado de fosforilación de su dominio regulador ubicado en el extremo N-terminal, que tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática. Esta inhibición desaparece cuando se activa la enzima mediante la fosforilación de los residuos de serina S8, S19, S31, S40 y S153 (Goldstein y Lieberman, 1992).

Posteriormente, en la síntesis de dopamina, la enzima dopa Descarboxilasa, una descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, cataliza la remoción del grupo carboxilo de dopa para formar dopamina. Esta enzima tiene una tasa de actividad elevada, lo que implica que, en condiciones fisiológicas, la concentración de dopa en la mayoría de las células es baja ya que el estado de equilibrio tiende a la conversión de dopa a dopamina. En algunas células, la dopamina es transformada a otras catecolaminas como la adrenalina o la noradrenalina, pero en las neuronas de la sustancia nigra la dopamina es el producto final de esta ruta de biosíntesis. Una vez que la dopamina es sintetizada en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas, es almacenada rápidamente en vesículas sinápticas mediante un transportador dependiente de ATP en un proceso acoplado al cotransporte de protones.

En la transmisión sináptica, la concentración de dopamina en el espacio extracelular se regula por medio de un proceso de recaptura que involucra la participación de un transportador proteico ubicado en la membrana celular de las neuronas dopaminérgicas. El transportador de dopamina utiliza el gradiente de sodio para cotransportar  $\text{Na}^+$  y dopamina hacia el citoplasma, donde la mayor parte de la dopamina es almacenada nuevamente en vesículas sinápticas. La dopamina que queda en el citosol es transformada por la monoamino oxidasa mitocondrial en ácido valinilmandélico y 3-metoxi-4-hidroxi fenilglicol. Por otro lado, la dopamina extracelular que se difundió de la región sináptica es degradada por la monoamino

oxidasa extracelular o por la catecol-O-metil transferasa (Bannon, 2005).

La actividad biológica de la dopamina ocurre mediante su interacción con receptores específicos que han sido clasificados en dos familias en función de su estructura proteica, secuencia génica y de su acoplamiento a sistemas de transducción de señales. Los receptores de la familia I (receptores D-1 y D-5) están acoplados a proteínas G estimuladoras ( $G_s$  o  $G_o$ ) que activan a la adenilato ciclasa y promueven la formación de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), mientras que los receptores de la familia II (receptores D-2, D-3 y D-4) están acoplados a proteínas  $G_i$  que inhiben a la adenilato ciclasa y, en consecuencia, disminuyen la concentración de AMPC. La activación de cualquiera de las dos familias de receptores resulta en la modulación de la actividad neuronal mediante la modificación de la actividad de numerosos canales iónicos dependientes de voltaje. Los efectos excitadores o inhibidores de la dopamina en la transmisión sináptica, en el metabolismo intracelular y en la expresión de genes regulada por este neurotransmisor dependen de la expresión de los diferentes receptores a dopamina en las neuronas postsinápticas y del contexto celular que promueva la activación de los receptores (Cooper, 2003).

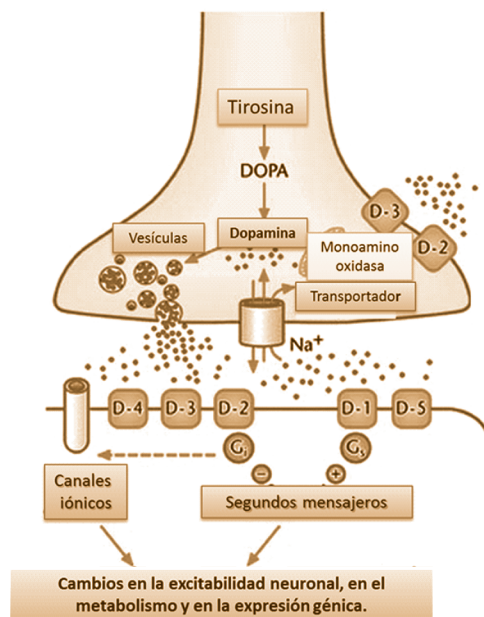


Figura 2. Almacenamiento, liberación, recaptura y procesamiento de la dopamina.



La mayoría de las neuronas dopaminérgicas se encuentran en el cerebro medio, en la sustancia *nigra* y en el área ventral tegmental adyacente, prolongando sus fibras nerviosas a extensas áreas del cerebro anterior. Las neuronas dopaminérgicas más activas proyectan hacia el estriado, donde se modulan la postura y el movimiento. Las células dopaminérgicas que tienen origen en el área ventral tegmental inervan estructuras límbicas como el núcleo *accumbens*, la amígdala y el *septum*, donde se piensa que la dopamina modula las emociones y la motivación. Otras neuronas del área ventral tegmental proyectan hacia regiones corticales como la corteza frontal cingulada, donde la dopamina tiene efectos sobre procesos cognitivos y de atención (Smith y Villalba, 2008).

### El circuito motor de los ganglios basales y sus alteraciones en la EP

En la EP, la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* causa una deficiencia severa de dopamina y de sus metabolitos, lo que genera los tres principales síntomas de la enfermedad: la bradicinesia, la rigidez muscular y los temblores, mientras que la neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas en regiones mesolímbicas y mesocorticales se relaciona en mucho menor proporción con perturbaciones en la atención y en la memoria. Sin embargo, los síntomas principales de la EP se manifiestan clínicamente hasta que hay una pérdida de aproximadamente 70% de las neuronas dopaminérgicas que inerva el estriado (Braak et al., 2004). La pérdida de neuronas dopaminérgicas puede estar compensada mediante un aumento en la síntesis y liberación de dopamina o mediante un aumento en la expresión de receptores D2 en el estriado (Braak et al., 2004).

El putamen, que junto con el núcleo caudado constituye al estriado, es la entrada al circuito motor de los ganglios basales y recibe aferencias excitadoras glutamatérgicas de la corteza cerebral provenientes de áreas motoras precentrales. La salida del circuito se da a través del globo pálido interno y de la sustancia *nigra* reticulada, que envían proyecciones GABAérgicas inhibitorias hacia el tálamo ventral-anterior y ventral-lateral. El tálamo, a su vez, envía proyecciones glutamatérgicas de regreso hacia las áreas corticales motoras. De esta forma, la actividad de la corteza bloquea la inhibición que el globo pálido interno y la sustancia *nigra* reticulada ejercen sobre el tálamo. Este

bloqueo se da a través del putamen mediante dos vías paralelas: la vía GABAérgica directa, que va del putamen al globo pálido interno y a la sustancia *nigra* reticulada, y la vía indirecta, que tiene como relevos la inhibición del globo pálido externo, que a su vez inhibe al núcleo subtalámico que estimula al globo pálido interno y a la sustancia *nigra* reticulada (figura 3) (Albin et al., 1989).

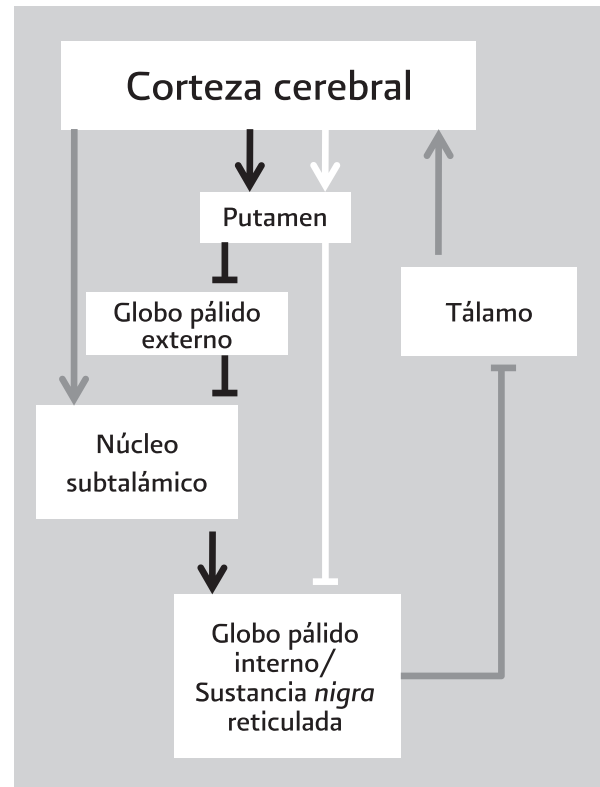


Figura 3. El circuito motor de los ganglios basales. La vía de inhibición GABAérgica directa se muestra en naranja y la vía indirecta en negro.

Este arreglo inhibitorio y excitador facilita la actividad del tálamo cuando se activa la vía directa y, por el contrario, su actividad se inhibe al activarse la vía indirecta. La dopamina proveniente de la sustancia *nigra* regula la actividad de estos sistemas opuestos. La dopamina produce un aumento en la actividad de los receptores D-1 del putamen, para favorecer las proyecciones de la vía directa, al tiempo que se inhibe la actividad de los receptores D-2, para mantener apagada la ruta indirecta del circuito motor.

La disfunción dopaminérgica en la EP origina entonces un aumento en la vía inhibitoria al mantenerse la actividad de las neuronas GABAérgicas del globo pálido medial y de la sustancia *nigra* reticulada, lo que produce la inhibición del movimiento coordinado por regiones corticales, que se manifiesta como bradicinesia (Hornykiewicz, 1998). Por otro lado, en el globo pálido, los núcleos subtalámicos y el núcleo accumbens, los niveles de dopamina están reducidos en 40- 80%. La pérdida de la modulación de la dopamina en los segmentos pálidos y en núcleos subtalámicos que participan en el circuito motor antes descrito podría agravar los problemas motores de la EP, mientras que en el núcleo *accumbens* la pérdida de neuronas dopaminérgicas afecta funciones tanto motoras como límbicas, en especial las relacionadas con la motivación, lo que contribuye tanto al deterioro motor como a la manifestación de la depresión clínica que padecen algunos pacientes (Hornykiewicz, 1998).

La enfermedad de Parkinson actualmente no tiene cura y el tratamiento a los pacientes consiste en aliviar los síntomas, lo que involucra, principalmente, reducir la agitación muscular involuntaria y conferirle al enfermo un mayor control de los movimientos voluntarios. Si la pérdida de la dopamina en áreas del cerebro como la sustancia *nigra* y el estriado es la causa del descontrol motor que sufren los pacientes, la recuperación de la misma puede conferir una mejoría. La administración de levodopa, un fármaco precursor de la dopamina, junto con inhibidores de la monoamino oxidasa y la catecol-O-metil transferasa, incrementa la concentración de dopamina que las neuronas pueden almacenar y utilizar en el control de los movimientos. Sin embargo, el progreso de la degeneración neuronal de la sustancia *nigra* y una prolongada exposición a levodopa terminan por disminuir la eficacia del tratamiento e, incluso, propician la aparición de nuevos síntomas como movimientos involuntarios llamados discinesias, de tal forma que este tratamiento no representa una solución definitiva para la EP (Poewe *et al.*, 2010).

La fisiología de las neuronas dopaminérgicas es particular, a diferencia de otros tipos neuronales; las neuronas de la sustancia *nigra pars compacta* son autónomicamente activas, generando potenciales de acción regulares de 2 a 4 hertzios en la ausencia de una entrada sináptica (Grace y Bunney, 1983), lo que les confiere una actividad

de marcapaso que puede ser importante para mantener los niveles de dopamina en las regiones inervadas en el estriado. Sin embargo, esta característica también podría incrementar la susceptibilidad a la neurodegeneración mediada por procesos intracelulares derivados de alteraciones en la homeostasis del calcio, ya que la entrada constante de este catión es, en parte, responsable de la actividad de marcapaso (Puopolo *et al.*, 2007).

### Modelos experimentales para el estudio de la EP

La mayoría de los modelos experimentales *in vivo* de la EP hacen uso de fármacos (Beal, 2001). El primer fármaco empleado para modelar esta enfermedad fue la 6-hidroxi-dopamina, la cual se acumula dentro de las neuronas dopaminérgicas e induce la muerte celular a través de un mecanismo oxidante; aunque este modelo no reproduce la aparición de cuerpos de Lewy, sí provee una característica funcional que puede ser evaluada, ya que las ratas tratadas con 6-hidroxi-dopamina y anfetaminas presentan una conducta de giro ipsilateral que es proporcional a la severidad de la lesión en el cerebro (Beal, 2001). Otro fármaco que se ha empleado para modelar esta enfermedad es la rotenona, un insecticida que inhibe con alta afinidad al complejo I de la cadena respiratoria; la administración de rotenona a ratas causa la degeneración de las neuronas nigroestriales con los marcadores bioquímicos característicos de la EP, como la disminución de la TH, el transportador de dopamina y el transportador vesicular de monoaminas y la aparición de inclusiones citoplasmáticas similares a los cuerpos de Lewy.

El modelo mejor caracterizado para reproducir la patología de la EP hace uso de la toxina metil-fenil-tetrahidropiridina o MPTP, un producto tóxico derivado de la síntesis de un análogo de la heroína. El MPTP es catabolizado por la monoamino oxidasa en MPP<sup>+</sup>; esta molécula se puede incorporar a las neuronas nigroestriales a través del transportador de dopamina; una vez adentro, es capturada y acumulada en las mitocondrias donde funciona como inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria. Adicionalmente al bloqueo de la cadena respiratoria, el MPP<sup>+</sup> causa la muerte neuronal a través de mecanismos oxidantes.

Existen pocos modelos transgénicos de la EP, uno de ellos expresa una mutante de  $\alpha$ -sinucleína bajo el control transcripcional de Thy1. La expresión de la  $\alpha$ -sinucleína

mutada induce la aparición de algunos rasgos de la EP como un incremento de esta misma proteína en las neuronas y la presencia de cuerpos de Lewy en algunas regiones cerebrales (Van der Putten *et al.*, 2000).

Como es el caso de todas las enfermedades neurodegenerativas, los procesos celulares y moleculares que subyacen a la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la EP no se conocen por completo. La selectividad de la muerte neuronal, en este y en los padecimientos similares, es un fenómeno que no se tiene bien entendido. Aunque se sabe que la tasa metabólica de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* es alta y es susceptible a procesos oxidantes generalmente asociados a un mal funcionamiento del complejo I de la cadena respiratoria en las mitocondrias de estas neuronas y a una elevada presencia de hierro que puede favorecer la síntesis de productos de oxidación, no se sabe por qué otro tipo de neuronas con tasas metabólicas igualmente elevadas y susceptibles al estrés oxidante no se pierden en esta enfermedad.

Como se mencionó anteriormente, los síntomas de la enfermedad pueden ser aliviados, aunque de manera temporal, con la estimulación de la síntesis de dopamina en el cerebro. Actualmente, se exploran mecanismos, como la estimulación magnética transcraneal o la terapia con células troncales, que puedan incrementar la síntesis de dopamina y conferir la estabilidad del circuito motor de los ganglios basales con efectos más duraderos. Debido a la alta prevalencia de la enfermedad, el entendimiento de los procesos biológicos que dan origen a la EP y la implementación de terapias efectivas derivadas del mismo resultan un asunto de gran importancia.

1. Abeliovich A, et al. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 2000;25:239-252.
2. Albin, RL, et al. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 1989;12:366-375.
3. Bannon MJ. The dopamine transporter: role in neurotoxicity y human disease. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005;204:355-360.
4. Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2001;2:325-334.
5. Bonifati V, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 2003;299:256-259.
6. Braak H, et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*, 2004;318:121-134.
7. Cooper JR, BF. a. RR. (Ed.) *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Oxford Universty Press, New York. 2003.
8. Eriksen N, et al. Age y Parkinson's disease-related neuronal death in the substantia nigra pars compacta. *J Neural Transm*, 2009;Suppl:203-213.
9. Goldstein M, Lieberman A. The role of the regulatory enzymes of catecholamine synthesis in Parkinson's disease. *Neurology*, 1992;42:8-12; discussion 41-48.
10. Grace AA, Bunney BS. Intracellular y extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms y morphological correlates. *Neuroscience*, 1983;10:317-331.
11. Greenwood CE, et al. Increased dopamine synthesis in aging substantia nigra neurons. *Neurobiol Aging*, 1991;12:557-565.
12. Haavik J, Toska K Tyrosine hydroxylase y Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*, 1998;16:285-309.
13. Hornykiewicz O. Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology*, 1998;51;S2-9.
14. Kitada T, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 1998;392:605-8.
15. Najim al-Din AS, et al. Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis y dementia: Kufor-Rakeb syndrome. *Acta Neurol Scy*, 1994;89:347-352.

16. Pankratz ND, et al. Parkinson Disease Overview. 1993.
17. Petit, A, et al. Wild-type PINK1 prevents basal y induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem*, 2005;280:34025-34032.
18. Poewe W, et al. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. *Clin Interv Aging*, 2010;5:229-238.
19. Puopolo M, et al. Roles of subthreshold calcium current y sodium current in spontaneous firing of mouse midbrain dopamine neurons. *J Neurosci*, 2007;27:645-656.
20. Ramirez A, et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*, 2006;38:1184-1191.
21. Rudow G, et al. Morphometry of the human substantia nigra in ageing y Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 2008;115:461-470.
22. Shimura H, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*, 2000;25:302-305.
23. Smith Y, Villalba R. Striatal y extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal y Parkinsonian brains. *Mov Disord*, 2008;23 Suppl 3:S534-S547.
24. Stark AK, Pakkenberg B. Histological changes of the dopaminergic nigrostriatal system in aging. *Cell Tissue Res*, 2004;318:81-92.
25. Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 2007;16 Spec No. 2:R183-R194.
26. Valente EM, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 2004;304:1158-1160.
27. Van der Putten H, et al. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci*, 2000;20:6021-6029.
28. Yavich L, et al. Abnormal compartmentalization of norepinephrine in mouse dentate gyrus in alpha-synuclein knockout y A30P transgenic mice. *J Neurochem*, 2006;99:724-732.
29. Yavich L, et al. Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J Neurosci*, 2004;24:11165-11170.
30. Zhang Y, et al. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase y promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000;97:13354-13359.

Ver página 138.

**María del Carmen Palacios Reyes**

Unidad de Investigación Médica en Genética  
Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico  
Nacional Siglo XXI, IMSS.  
cyapalacios@gmail.com

1. Aumento en la rigidez de grandes arterias
2. Disfunción endotelial vascular

El envejecimiento cardiovascular es el factor de riesgo más importante de enfermedad cardiovascular. Las principales alteraciones que se desarrollan conforme avanza la edad son la rigidez vascular y la disfunción endotelial. La primera está dada por alteraciones en las fibras de la matriz intercelular, predominantemente por colágena, el factor de crecimiento transformante beta, las enzimas metaloproteinasas y los inhibidores tisulares de metaloproteinasas. La segunda se define por alteraciones en la respuesta vasodilatadora a los cambios en el tono vascular mediado por el flujo. El factor esencial que contribuye a este último proviene de la disminución en la producción de óxido nítrico endotelial, (principal vasodilatador regulado por el tono vascular) y, en forma secundaria, por una mayor derivación de esta vía hacia la ruta de arginasa (que conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno -ROS- como anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo (OH) y peroxinitritos). Por otro lado, el acortamiento telomérico, generado mediante divisiones celulares consecutivas y que conduce a disfunción del telómero, participa en la senescencia celular o apoptosis. Por lo tanto el aumento en la producción de ROS, particularmente a nivel mitocondrial, la disminución en la actividad y/o expresión de enzimas de los sistemas antioxidantes y la disfunción telomérica, son los factores que más contribuyen a generar cambios asociados al envejecimiento cardiovascular. Sin embargo, existen otros factores relevantes que no se deben perder de vista como la inflamación (dada principalmente por NFkB), el daño al ADN generado por el incremento de los radicales libres, cambios en la expresión de endotelina-1 (vasoconstrictor) y tetrahidbiopterina, entre otros.

### **Envejecimiento cardiovascular**

La principal causa de mortalidad en el mundo la ocupan las alteraciones cardiovasculares y 80% se asocia con daño a nivel vascular. Además de diversos factores de riesgo ambientales, el que representa el mayor riesgo es la edad avanzada. A medida que envejecemos se presentan diversos cambios tanto a nivel estructural como funcional (Minamino *et al.*, 2007; Lakkata, 2003; Wu *et al.*, 2011; Maruyama, 2011).

Los principales cambios cardiovasculares que se desarrollan conforme aumenta la edad son:

### **Rigidez vascular**

Una de las funciones de las grandes arterias es “amortiguar” el impacto hemodinámico del aumento de volumen derivado de cada contracción sistólica, favoreciendo el flujo adecuado a nivel cardíaco y periférico, el cual es regulado por el tono de los vasos sanguíneos. El tono vascular de las grandes arterias cambia a lo largo de la vida, de tal manera que al envejecer se incrementa la rigidez, lo cual genera diversos cambios en el sistema cardiovascular:

- Aumenta la poscarga del corazón, lo que conlleva a hipertrofia ventricular, misma que es predictora de mortalidad en general y de mortalidad cardiovascular.
- Disminuye la perfusión arterial coronaria por deficiencia en la presión diastólica y, por lo tanto, genera isquemia miocárdica y probablemente contribuye al desarrollo de falla cardíaca del anciano.
- Genera aumento de la presión del pulso, lo que produce más cambios elásticos en la pared arterial, lo que a su vez acelera procesos ateroscleróticos e hipertensión.

Además de las repercusiones hemodinámicas, la rigidez se asocia a cambios estructurales y cambios moleculares en las paredes arteriales. Los cambios estructurales de la pared vascular están dados principalmente por cambios en la expresión génica, cambios arquitecturales como el remodelamiento de la matriz extracelular y cambios en la bioactividad de proteínas estructurales de las paredes de los vasos (Kovacic *et al.*, 2011A; Kovacic *et al.*, 2011b; Díez, 2007).

### **Fibras de la matriz intercelular**

El remodelamiento vascular consiste básicamente en cambios en el grosor de las capas íntima y medial de los vasos sanguíneos. El engrosamiento está dado por el remodelamiento de la matriz extracelular, la cual presenta cambios en los elementos estructurales de la pared arterial como pérdida y fragmentación de elastina, fractura de fibras elásticas y calcificación de paredes, aumento de colágeno, cambios en el número de puentes cruzados entre las fibras de colágeno y aumento de fibronectina. Estos cambios se han descrito principalmente en la capa media de los vasos, pero aún falta determinar los cambios que pudieran existir en la adventicia.

La relevancia que tienen la colágena I y III es que son las proteínas principales de la matriz, ya que representan 90% de las colágenas de la pared arterial. Las fibras de colágeno I y II tienen mayor expresión en la capa adventicia de la carótida de ratones viejos con respecto a jóvenes, y menor en la capa media y en toda la pared arterial. Además de los cambios en la cantidad y enlaces de las fibras elásticas, se presentan modificaciones del colágeno y elastina como la glicosilación, en donde específicamente la glicooxidación confiere aumento en la rigidez arterial (Hae-Young y Byung-Hee, 2010; Benetos *et al.*, 2002; Blacher y Safar, 2005; Fleenor *et al.*, 2010; Ramasamy *et al.*, 2005; Yasmin y O'Shaughnessy, 2008).

Otro mecanismo que se asocia a cambios estructurales y cambios moleculares en las paredes arteriales es mediado principalmente por elementos como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ 1), citocina profibrótica que estimula la síntesis de fibras de la matriz y tiene actividad antiproliferativa. Al envejecer, se aumenta su expresión pero disminuye su actividad antiproliferativa aunque sigue actuando en la supresión de proteasas y en la activación de inhibidores tisulares de metaloproteasas de la matriz (MMPs).

En la rata, a medida que envejece, se genera aumento de la fibronectina y colágeno en células de la íntima vascular, lo cual se asocia con incremento en la expresión de TGF $\beta$ . A nivel de la adventicia, se incrementa la cantidad de colágena I y III, esto también está asociado con el aumento de TGF- $\beta$ 1. Se asocia, además, con un aumento de la alfa-actina de músculo liso, que es un marcador de transformación fibroblástica de la adventicia a un fenotipo secretor (miofibroblasto productor de colágeno), por lo que el aumento de TGF- $\beta$ 1 contribuye a la transformación de las células a un fenotipo profibrótico y, por lo tanto, favorece la transformación de los fibroblastos a miofibroblasto con el consecuente aumento en la síntesis de fibras de la matriz.

A nivel de capa media, los ratones viejos presentan menor expresión de elastina, lo que se asocia con menor expresión de lisil-oxidasa, enzima prosintética de elastina y mayor expresión de la enzima degradadora de elastina MMP2; la disminución de lisil-oxidasa se asocia al aumento de TGF- $\beta$ 1.

Por otro lado, el TGF- $\beta$ 1 aumenta la producción de superóxido y depósito de colágeno tipo I y podría inducir en fenotipo osteogénico de fibroblastos, asociándose, por lo tanto, con la calcificación mediada por inflamación, elastolisis y estrés oxidativo.

También existen cambios en mecanismos que tienen que ver con la angiogénesis y vasculogénesis, como el aumento de metaloproteinasas de la matriz MMPs-2 y 7 y disminución de MMP-9, así como aumento de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). Algunos de estos cambios se correlacionan con alteraciones en la función ventricular; en ratones, por ejemplo, el aumento de MMP2 modifica el remodelamiento de la aorta y el de TIMP-2 altera la angiogénesis.

Aunado a la rigidez vascular, durante el proceso de envejecimiento también se presentan anomalías estructurales a nivel cardiaco:

- Hipertrofia del cardiomiocito
- Aumento de la matriz intercelular
- Aumento de colágeno
- Disminución en el número de cardiomiocitos por necrosis y apoptosis.

Estos cambios estructurales repercuten en la contractilidad del miocardio, en la prolongación de la contracción y relajación del corazón, y en la sensibilidad al calcio. Los cambios estructurales están dados por estrés oxidativo, alteraciones en la reparación celular, acortamiento de telómeros, alteraciones metabólicas, cambios en las modificaciones postraduccionales y procesos inflamatorios, necrosis y apoptosis.

Además de la rigidez vascular, se desarrolla rigidez cardiaca. Esta se atribuye al aumento de fibronectina (ya que se ha reportado su aumento en el corazón de rata hipertensivo senescente), al aumento de colágeno (que se asocia con el aumento en la rigidez diastólica), al aumento de puentes cruzados entre proteínas, al aumento de la glicosilación de proteínas y a alteraciones en la expresión de metaloproteinasas de la matriz. Estas últimas son endopeptidasas dependientes de zinc que degradan las proteínas de la matriz extracelular y son inhibidas por TIMPs; se ha descrito el aumento de MMP-3, 8, 9 y 12 y disminución de TIMP-3 y 4 en el ratón anciano

(Ramasamy *et al.*, 2005; Yasmin, O’Shaughnessy, 2008; Cattan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

**Factores genéticos**

Otros factores intrínsecos corresponden a los factores genéticos. Se reconocen varios que contribuyen al desarrollo de la rigidez arterial. Uno de los primeros factores en evaluarse fue la heredabilidad, ya que descendientes de individuos con historia parental de infarto de miocardio, diabetes, hipertensión o enfermedad arterial coronaria prematura presentan mayor rigidez en un rango de 0.21 a 0.59. (Yasmin y O’Shaughnessy, 2008). Una de las hipótesis que señalan el punto de partida del envejecimiento consiste en los cambios en la remodelación de la pared arterial. Como ya se mencionó, además del engrosamiento de las grandes arterias, a expensas de la capa íntima y media, se encuentran otros cambios como la proliferación de músculo liso, la invasión de la pared por células hematopoyéticas de médula ósea, aumento de la matriz intercelular y cambios en las fibras, los cuales provocan disfunción endotelial que se hace manifiesta con la disminución en la producción de óxido nítrico (Yasmin, O’Shaughnessy, 2008; Cattan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Versari *et al.*, 2009).

**Disfunción vascular endotelial**

Una de las estructuras biológicas afectadas por el envejecimiento es el endotelio, el cual tiene la función de actuar en la regulación mediada por volumen de la función y estructura vascular. La vasodilatación mediada por endotelio está en función de la producción y acción del óxido nítrico, el cual puede liberarse en respuesta a la acción de acetilcolina, o bien, por relajación del músculo liso mediada por la acción de prostaglandinas vasodilatadoras que se producen al aumentar el flujo vascular.

La disfunción endotelial se define como la alteración en la vasodilatación, dependiente de endotelio, y el principal factor involucrado es el óxido nítrico (ON). La respuesta vasodilatadora disminuye con la edad, a partir de los 50 años en las mujeres y de los 40 en los varones. De acuerdo con la función que tiene, esta disminución provoca que se desregule el tono vascular y se genere un ambiente proaterosclerótico y protrombótico. Por tanto, el endotelio tiene la función de producir óxido nítrico y funciona en forma autócrina y parácrina al secretar sustancias que controlan el tono y la estructura (Versari *et*

*al.*, 2009; Celermajer *et al.*, 1994; Taddei y Viridis, 1995; Santhanam *et al.*, 2007).

**Óxido nítrico**

El óxido nítrico (ON) es una molécula producida por el endotelio vascular, cuya función es mediar la vasodilatación de acuerdo con el tono. Es considerado un vaso y cardioprotector, ya que inhibe la migración y adhesión celular, la adhesión y agregación plaquetaria, así como la migración y crecimiento de células de músculo liso (Maruyama, 2011). Otras de sus funciones son regular la proliferación de músculo liso, el depósito de la matriz extracelular y la muerte celular endotelial.

El óxido nítrico se genera por medio de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS o enzima tipo III), a partir de L-arginina, generando L-ornitina y óxido nítrico. La enzima eNOS requiere de cofactores como tetrahidrobiopterina. Está regulada por la enzima arginasa, la cual compite con ella por la L-arginina produciendo urea y citrulina, como se muestra en la figura 1.

**L-Arginina**

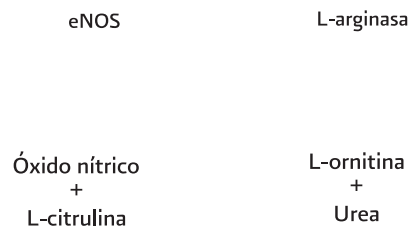


Figura 1. Vía de producción de óxido nítrico (eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial).

El ON ejerce su función a nivel cardiovascular mediante varios mecanismos como la producción de agonistas endoteliales que actúan en receptores y que producen vasodilatación (como acetilcolina y bradicinina), la regulación de la proliferación de músculo liso, la regulación del depósito de la matriz intercelular, la regulación de muerte celular endotelial, la liberación de endotelina-1 (vasoconstrictor producido en endotelio) y la producción de prostanoides.

El envejecimiento vascular se caracteriza por la disminución en la producción de ON por las células endoteliales, lo que



confiere a su vez disfunción de la célula endotelial. De acuerdo con la función que tiene, esta disminución provoca que se desregule el tono vascular y se genera un ambiente o transición del endotelio a un estado proaterosclerótico y protrombótico, lo que corresponde a lo que se define como disfunción vascular endotelial.

Clínicamente, la disfunción endotelial se asocia al factor de riesgo cardiovascular de envejecimiento, contribuyendo, por lo tanto, al desarrollo de enfermedades a este nivel, principalmente en aterosclerosis.

El avance en la edad y la disminución de ON asociada generan cambios secundarios como la disminución de la vasodilatación mediada por endotelio en los grandes vasos, alteración de la vía L-arginina óxido nítrico (reversible con L-arginina), desregulación del consumo miocárdico de  $O_2$  (en ratas) y promoción de apoptosis de células endoteliales.

Los mecanismos que explican la disminución de ON son diversos, uno de ellos es la generación excesiva de ROS. El anión superóxido puede reaccionar con ON generando peroxinitrato (ONOO<sup>-</sup>), el cual tiene la capacidad de penetrar la membrana y producir sustratos nitrato, que a su vez inactivan a receptores reguladores y enzimas del procesamiento de radicales libres.

El aumento de ROS como  $O_2^-$ , OH y  $H_2O_2$ , así como de especies reactivas de nitrógeno ONOO<sup>-</sup>, generan cambios inflamatorios ya que tienen la capacidad de actuar como segundos mensajeros y participar en la producción de moléculas proinflamatorias (Santhanam *et al.*, 2007; Camici *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009; Taddei y Viridis, 2001; Kim *et al.*, 2009).

### **Arginasa**

La vía de la L-arginina es uno de los caminos a partir del cual se produce y regula la producción del óxido nítrico. La arginasa-a es la enzima limitante del índice del ciclo de la urea y compite con el óxido nítrico sintasa (eNOS) por el sustrato L-arginina para regular a eNOS; produce citrulina, la cual a su vez inhibe moderadamente a la arginasa. El ON también regula la actividad de la arginasa, activándola vía S-nitrosilación de residuos 168 y 303. Al incrementar la edad, se incrementa la expresión de arginasa y la S-nitrosilación de sus residuos, por lo que aumenta su

expresión y actividad, superando a eNOS y disminuyendo la producción de óxido nítrico, efecto que está asociado con la disfunción endotelial del envejecimiento cardiovascular. Además, el aumento de arginasa se asocia con falla cardíaca. Una de las funciones principales de esta vía es regular la producción de óxido nítrico, ya que la sobreexpresión de éste provoca apoptosis, por lo que los niveles adecuados de ON son importantes. Otro factor que contribuye a la disfunción endotelial en esta vía es la disminución en la disponibilidad intracelular de L-arginina, favoreciendo la disminución de ON. Cabe hacer notar que a nivel de la microcirculación, el transporte de L-arginina no se altera ni se aumenta su degradación por arginasa, por lo que a este nivel la deficiencia de sustrato no está involucrada.

De lo anterior se desprende que la nitrosilación y las alteraciones en L-arginina y arginasa contribuyen con la disfunción endotelial (Kim *et al.*, 2009; Santhanam *et al.*, 2008; Ahlers, 2004; Eskurza *et al.*, 2005) (figura 2).

### **Tetrahydrobiopterina**

Otro de los factores que participan en la disfunción endotelial y que disminuye su concentración con la edad es la tetrahydrobiopterina (BH4), cofactor de eNOS. Se considera un mecanismo regulador de la dilatación pues contribuye a la disminución de ON con la edad, ya que al administrarse aumenta la dilatación mediada por flujo (Goel *et al.*, 2010).

### **Endotelina-1**

Otro de los factores relevantes en la fisiología endotelial vascular está dado por moléculas mitógenas y contráctiles, específicamente endotelina 1 (ET-1). Esta proteína es considerada el vasoconstrictor más potente producido por el endotelio y tiene un efecto antagónico a la vasodilatación mediada por ON. La producción de ET-1 por células endoteliales de aorta *in vitro* es mayor en aquellas derivadas de individuos de mayor edad con respecto a jóvenes y los niveles de expresión aumentan con la edad en individuos ancianos sanos, además de contribuir a la función vasoconstrictora en arterias periféricas (Goel *et al.*, 2010; Van Guilder *et al.*, 2007; Versari *et al.*, 2009). Otro mecanismo que explica la disminución de ON es la disminución en la expresión de eNOS endotelial, tanto del transcrito como de la proteína (en arterias de roedores viejos), así como en arterias mamarias de pacientes con

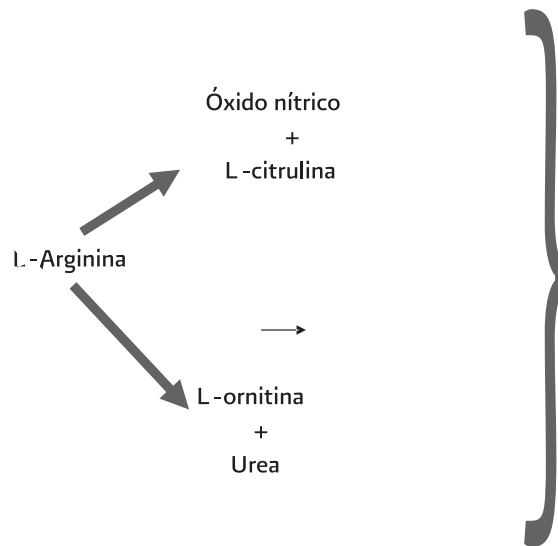


Figura 2. Cambios en la vía de L-arginina conforme avanza la edad: disminución en la actividad de óxido nítrico sintasa y en la producción de óxido nítrico, y aumento en la actividad de L-arginasa que repercute en el aumento de nitrosilación de moléculas.

enfermedad coronaria. La disminución de ON, de eNOS y la menor disponibilidad intracelular de L-arginina a nivel cardiaco provocan que se limite el suplemento de sangre, que se altere el consumo de O<sub>2</sub> por el miocardio y, por ende, la contractilidad cardiaca, y que aumente la apoptosis de células endoteliales.

Otros factores que se presentan con la edad son el aumento en la expresión de enzimas mitocondriales como NADPH oxidasa, la disminución en la expresión de sistemas antioxidantes como superóxido dismutasa y la alteración en la producción de prostanoïdes y, por lo tanto, daño endotelial. De hecho, en vasos grandes, la vasodilatación mediada por endotelio disminuye progresivamente con la edad (con 10 años de retraso en mujeres con respecto a hombres) (Tokunaga *et al.*, 1992).

### NFκB

Otro de los mecanismos involucrados en la disfunción vascular y en el envejecimiento involucra procesos inflamatorios. El factor que contribuye principalmente es NFκB (factor nuclear kappa B subunidad de unión a ADN). Es un factor de transcripción sensible a redox que se expresa en músculo liso y en endotelio de la vasculatura e induce la expresión de moléculas inflamatorias como interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), MCP1, interleucina 1β (IL-1β), quemocinas y moléculas de adhesión (figura 3).

Figura 3.. Procesos inflamatorios asociados a la edad: activación de la transcripción de moléculas proinflamatorias mediante el NFκB (factor de transcripción kappa B).

El NFκB se activa con el incremento de ROS. Conforme avanza la edad, aumenta su expresión en células endoteliales así como su actividad de unión al ADN, con mayor abundancia en el núcleo, y se asocia a cambios en la expresión de citocinas a un perfil proinflamatorio tanto en vasos como en corazón. El incremento de NFκB se asocia con la disminución de IκBα, uno de sus inhibidores, el cual actúa suprimiendo la translocación de

NFκB del citoplasma al núcleo. La activación crónica de NFκB contribuye a la predisposición a aterosclerosis. Por lo tanto, el envejecimiento está asociado con el desarrollo de un fenotipo proinflamatorio a nivel endotelial vascular de adultos sanos.

Una forma de abordar el envejecimiento celular es dividir cambios en dos niveles: cambios celulares inherentes o intrínsecos y cambios extrínsecos (donde las células están expuestas a desregulación de vías de señalización). Dentro de las alteraciones extrínsecas se encuentran aquellas mediadas por inflamación y quizá la más estudiada y relevante está dada por el estrés oxidativo (Csiszar *et al.*, 2008; Donato *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009; Donato *et al.*, 2009; Donato *et al.*, 2007).

### **Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Las especies reactivas de oxígeno comprenden un grupo de moléculas y radicales libres derivados del oxígeno molecular producidos en la mitocondria. Un radical libre se refiere a un átomo o grupo de átomos o moléculas que portan un electrón desapareado en su orbital externo, lo que le confiere muy alta reactividad y, por ende, una fuerte tendencia a interactuar con otros electrones para así obtener una configuración más estable y formar un enlace químico. La molécula con la que interactúa se convierte en un radical.

Los principales radicales libres son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo (OH). El  $O_2^-$  es producto de la reducción de un electrón de oxígeno y es precursor de muchas ROS. Se produce por la enzima NADPH oxidasa, localizada en la membrana de diferentes tipos de células como los polimorfonucleares, macrófagos y a nivel de células endoteliales o por la citocromo P450. La cadena de transporte electrónico mitocondrial tiene muchos centros redox que pueden ceder electrones al oxígeno, constituyendo la principal fuente de anión superóxido en muchos tejidos; su producción se puede dar en la membrana mitocondrial externa, en la matriz y a ambos lados de la membrana mitocondrial interna. El que se genera en la matriz es eliminado en ese mismo lugar, mientras que el del espacio intermembranas puede transportarse al citoplasma por canales aniónicos dependientes de voltaje, donde reacciona con otras moléculas.

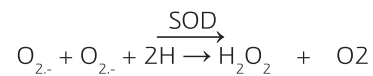
El peróxido de hidrógeno se produce a partir de la dismutación del anión superóxido en forma espontánea o

por acción de la enzima superóxido dismutasa y puede ser reducido a agua o parcialmente a radical hidroxilo OH, uno de los oxidantes más fuertes de la naturaleza.

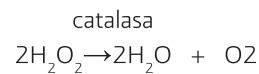
El radical superóxido OH reacciona con otros radicales como el óxido nítrico, formando peroxinitrito, oxidante muy potente y, generalmente en el sitio donde se forma, reacciona con cualquier molécula presente (lípidos, proteínas o ADN).

Normalmente hay un balance entre la producción y eliminación de ROS, este último proceso debido a la acción de antioxidantes (sustancias que protegen a la célula de efectos adversos de xenobióticos, drogas, carcinógenos y reacciones tóxicas). Dichos antioxidantes pueden actuar directamente destruyendo al anión superóxido o radicales libres, o estimular mecanismos de detoxificación. Las enzimas antioxidantes más representativas son superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

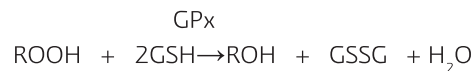
La SOD cataliza la conversión del radical libre superóxido a peróxido de hidrógeno, que a su vez puede ser eliminado por la catalasa o la peroxidasa.



La catalasa reacciona con el peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno molecular y su cofactor es el NADPH, que protege de la oxidación mediada por el sustrato.



La glutatión peroxidasa (GPx) cataliza diversas reacciones de hidroperóxidos ROOH y  $H_2O_2$  utilizando glutatión reducido.



Los ROS se producen principalmente en mitocondria, a nivel de la membrana mitocondrial interna, sitio donde se localizan los complejos de la cadena respiratoria, aunque también se producen a nivel de peroxisomas. Estos organelos contienen diversas enzimas que producen peróxido de hidrógeno y superóxido, además de óxido

nítrico; también participan en el balance redox, ya que contienen enzimas antioxidantes como catalasa y superoxidodismutasa (SOD1).

El aumento de ROS ocasiona daño a la mitocondria –principal y específicamente al ADN mitocondrial– y genera mutaciones, lo que a su vez condiciona que se altere la función de las proteínas codificadas y, por tanto, de la cadena respiratoria, dando lugar a un mayor incremento de ROS. La mitocondria es el organelo más sensible a sufrir daño ocasionado por ROS, secundario a la cercanía del ADN mitocondrial a la membrana interna –sitio donde se generan ROS–, ya que carece de histonas protectoras y tiene poca actividad de reparación de mutaciones. Existe una correlación entre el estrés oxidativo y las mutaciones en el ADN mitocondrial.

El aumento de ROS puede generar apoptosis, ya que aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa que se produce por la glutatión intracelular y otros grupos (sulfhidrilo); por lo tanto, el citocromo c pasa del espacio intermembrana al citoplasma y se une a Apaf-1, que polimeriza y forma el apoptosoma y se activa la apoptosis a través de la activación de caspasas.

Una de las primeras propuestas para explicar el mecanismo del envejecimiento cardiovascular es la denominada teoría del envejecimiento de los radicales libres, que propone que los radicales libres producidos por el metabolismo normal causan daño oxidativo a macromoléculas, lo que ocasiona que se acumulen y se origine disfunción celular y, eventualmente, muerte celular.

El corazón es un tejido con alto metabolismo aeróbico, mediado por la abundancia de grandes mitocondrias, por lo que su función depende de que éstas y las células estén sanas. Cabe hacer notar que tanto en el tejido cardíaco como en el pulmón, el complejo III de la cadena respiratoria parece ser el responsable de la mayoría de la producción de anión superóxido, a diferencia del cerebro donde el principal responsable parece ser el complejo I. La reacción del anión superóxido con el óxido nítrico, se forma el peroxinitrito, que también es considerado un potente oxidante.

A medida que se envejece, se han descrito alteraciones como la disminución del transcrito de la subunidad I de

NADPH deshidrogenasa, de la subunidad 3 de citocromo c oxidasa y de citocromo b (en corazón de ratón envejecido), así como la disminución de los niveles de proteínas del complejo III-V (en el ventrículo izquierdo de monos envejecidos), disminución en la producción de proteínas antioxidantes como la superoxidodismutasa endotelial (eSOD) y la glutatión peroxidasa-1 por la mitocondria. También se ha reportado que aumenta la producción de oxidantes mitocondriales en el corazón.

Con el aumento en la edad, también se genera un incremento en la producción de  $O_2^-$  en arterias coronarias pequeñas, en arterias mesentéricas, en aorta y carótida (en roedores viejos). Además, cambios prooxidantes cambian el fenotipo vascular como aumento de la expresión de eNOS, aumento de la actividad de NADH oxidasa y disminución de antioxidantes como eSOD. El aumento de  $O_2^-$  inactiva funcionalmente al óxido nítrico (ON) al generar ONOO-, por lo que se disminuye el efecto cardioprotector y vasculoprotector que ejerce el óxido nítrico al no regular el flujo coronario normal, no inhibir la agregación plaquetaria, no inhibir la adhesión de células inflamatorias a las células endoteliales y no afectar vías inducidas por citocinas proinflamatorias. Los ROS también inhiben el crecimiento celular e inducen senescencia y muerte celular, ya que su aumento genera el aumento de marcadores de senescencia como p16INK4A, p19 y p14 ARF en células residentes cardíacas que actúan en el arresto del ciclo celular y muerte de la célula.

Si bien la mitocondria es el organelo más afectado, dañando primordialmente al ADN mitocondrial, también se puede ocasionar daño al ADN nuclear generando mutaciones, aunque se estima que el daño oxidativo a nivel de ADN nuclear es cuatro veces mayor que en el ADN mitocondrial debido a que en la mitocondria los sistemas de reparación están prácticamente ausentes. El daño oxidativo también es capaz de modificar los lípidos que conforman la membrana y, por lo tanto, alterar su función y modificar proteínas de tal manera que no se degraden de manera efectiva y pierdan su actividad catalítica (Csiszar *et al.*, 2005; Judge y Leeuwenburgh, 2007; Ivashchenko *et al.*, 2011; Di Lisa y Bernardi, 2005; Harman, 1956; Darley-Usmar *et al.*, 1995; Chernyak, 1997).

Por otro lado, entre los cambios intrínsecos generados durante el envejecimiento se han descrito alteraciones

funcionales como daño gradual en el número y en la función de células progenitoras cardíacas. Existe, de hecho, una correlación inversa entre el número de células progenitoras y la edad, por lo que dicho número puede ser un marcador predictivo de enfermedad cardiovascular. Además, en otras especies se ha reportado que la respuesta de estas células a estímulos angiogénicos es mayor en jóvenes que en viejos.

Las células madre y las de músculo liso también se ven afectadas. Las musculares lisas migran a la íntima engrosada y disminuyen en la capa media. Las células madre de médula ósea inducen migración del músculo liso de tal manera que se induce la formación de una nueva capa media y, por otro lado, se disminuye la capacidad de células madre.

### **Telómero**

Otro cambio intrínseco implica a los telómeros. Los telómeros son las estructuras terminales de los cromosomas (capuchas de nucleoproteínas), consisten en repetidos en tándem de la secuencia hexamérica TTAGGG/CCCTAA abarcando una longitud de cientos de pares de bases en el extremo 3' (aproximadamente 4 a 15 kb). Los telómeros tienen la función de proteger los extremos de los cromosomas durante cada división celular y, por lo tanto, mantener la integridad y la estabilidad del cromosoma (Judge y Leeuwenburgh, 2007; Ivashchenko *et al.*, 2011; Di Lisa y Bernardi, 2005).

Son sintetizados por un complejo de ribonucleoproteínas llamada telomerasa, que incluye a varias subunidades proteicas como TRAF1, TRAF2, Ku86, TIN2, entre otras. Esta enzima está disminuida o ausente en células somáticas, excepto en células con alto índice de división. La longitud del telómero depende predominantemente de la composición de proteínas asociadas, del nivel de estrés oxidativo y el nivel de actividad de la telomerasa; aunque hay otros factores descritos como los heredados y la exposición a radiación.

De estos factores, el principal es el grado de actividad de la enzima telomerasa, de tal manera que las células con telómeros cortos no tienen actividad de esta enzima y se hacen senescentes o sufren apoptosis más rápido que las células con actividad de telomerasa. De hecho, la telomerasa está activa en células germinales y células progenitoras

similares a células madre, pero no en la mayoría de tejidos somáticos. La actividad de esta enzima es relevante para el mantenimiento de la longitud del telómero en las células en estado replicativo y en envejecimiento. Su longitud disminuye en cada mitosis, ya que en cada división se degrada parte del extremo 3' por exonucleasas y se sintetizan dos secuencias suplementarias TTAGGG para alargar los telómeros, perdiéndose aproximadamente 20 a 200 pb en cada división. La división resulta en desgaste de los telómeros, lo que culmina en arresto proliferativo o senescencia celular después de un número finito de divisiones celulares, una barrera conocida como el límite de Hayflick. La proliferación más allá de este punto deriva en mayor erosión de telómero, disparando finalmente una agresiva inestabilidad cromosómica dada por eventos de ruptura y unión de cromosomas.

El estrés oxidativo ocasiona rupturas en la cadena de ADN, las de cadena sencilla se presentan preferentemente en los telómeros, lo que causa que se acelere la edición del telómero y las divisiones celulares subsecuentes. La exposición a radiación ocasiona inflamación, además de estrés oxidativo, lo que, aunado a la generación de rupturas de cadena sencilla y de doble cadena del ADN, afecta la biología de telómero (longitud y actividad de telomerasa).

El cambio más relevante en el ADN telomérico ocurre por oxidación de la guanina, produciendo aductos 8-oxodG y rupturas mediadas por el OH, lesiones que no se reparan debido al poco acceso de los sistemas de reparación en este ADN, por lo que se favorece el daño a este nivel. Por otro lado, *in vivo* se ha demostrado la coexistencia del aumento de ROS y de procesos inflamatorios, que repercuten en el acortamiento de telómeros. De hecho, hay una correlación inversa entre la actividad de telomerasa y los niveles de TNF- $\alpha$ , este último, mediador de procesos inflamatorios a través de NFkB.

Durante el envejecimiento se presenta disminución de la actividad de telomerasa, aumento en la producción de ROS y aumento de la actividad inflamatoria, repercutiendo, por tanto, en el tamaño de telómeros y en la senescencia replicativa. Uno de los cambios más importantes que se presentan a este nivel a medida que envejecemos es la disminución en la actividad de la telomerasa, lo que confiere que en las divisiones celulares subsecuentes el ADN es replicado de forma incompleta y, con la edad,

los telómeros se hacen más cortos. En ratones viejos, se ha descrito la presencia de telómeros más cortos a nivel de células madre cardíacas por lo que éstas pueden ser susceptibles a cambios senescentes.

Por lo tanto, el tamaño del telómero se asocia con enfermedades relacionadas con la edad, principalmente cardiovasculares, como la falla cardíaca crónica, la aterosclerosis, la disfunción ventricular, la calcificación coronaria y la estenosis valvular aórtica. La denominada hipótesis del telómero, propuesta por Brouillette en 2008, que consiste en la asociación entre la longitud del telómero corto heredado con el riesgo de enfermedad cardiovascular, transpone el mecanismo de senescencia replicativa a un nivel sistémico, esto es, que individuos que heredan telómeros cortos y tienen, por tanto, telómeros vasculares y sistémicos cortos tienen mayor riesgo de senescencia temprana de tejidos vasculares.

Estudios de leucocitos de sangre periférica en la población humana han correlacionado un mayor índice de mortalidad en individuos mayores de 60 años, con disminución en la actividad de telomerasa, aunque otros estudios no encuentran correlación entre telómero y años de vida saludable. En personas centenarias (de 100 años o más) y su descendencia se ha reportado asociación positiva entre la longitud del telómero y longevidad, específicamente de telómeros más largos con un mejor perfil de salud (disminución de enfermedades asociadas a la edad, mejor función cognitiva y perfil de lípidos), en comparación con controles.

La asociación que existe entre la longitud de los telómeros de leucocitos y de células de la pared vascular con el impacto en salud y enfermedad fortalece la hipótesis que relaciona al envejecimiento vascular acelerado con la predisposición a enfermedad vascular, y también justifica usar el tamaño de ADN telomérico para evaluar el envejecimiento vascular.

La longitud del telómero de los leucocitos es predictiva de enfermedad arterial coronaria y correlaciona con el estrés oxidativo e inflamatorio, y se relaciona con la presión de pulso (aumentada en varones que tienen telómeros cortos) y con la dureza arterial. El acortamiento de telómeros de leucocitos ha sido reportado en diversas patologías cardiovasculares, con respecto a controles

sanos, incluyendo hipertensión, enfermedad arterial coronaria y enfermedad cerebrovascular, así como obesidad y tabaquismo. El largo del telómero en leucocitos circulantes parece predictivo de eventos futuros de enfermedad coronaria cardíaca, particularmente en la edad media, en hombres de alto riesgo. Sin embargo, un enlace directo entre la longitud del telómero de los leucocitos y la pared vascular en pacientes no se ha confirmado, por lo que no es posible concluir que éste sea un índice de envejecimiento vascular.

Otras hipótesis mencionan que el acortamiento de la longitud del telómero en leucocitos circulantes en presencia de enfermedad vascular indica que la adición de telómero en leucocitos es consecuencia de procesos inflamatorios generalizados que acompañan a la enfermedad vascular o puede ser que no tenga que ver con patología o envejecimiento vascular.

A nivel de pared vascular, el contenido de ADN telomérico está reducido en biopsias de aneurisma aórtico *versus* aorta normal, así como en leucocitos de estos pacientes con respecto a controles, y existe una correlación positiva entre el contenido de telómero entre leucocitos y tejido, pero no entre telómero de biopsia de vasos y edad del paciente, o entre telómero de leucocitos y la edad en individuos enfermos y sanos (Sawabe, 2010; Ballard y Edelberg, 2008; Ballard y Edelberg, 2007; Saliques *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2008; Kurz *et al.*, 2004; Farsetti *et al.*, 2009; De Meyer *et al.*, 2011).

Las células endoteliales también presentan telómeros más cortos, además de una disminución de la actividad de telomerasa, actividad que se asocia con la capacidad proliferativa, supervivencia y función no sólo de células endoteliales, sino también de cardiomiocitos y células madre cardíacas. Este acortamiento provoca disfunción del telómero, lo que, a su vez, induce disfunción endotelial vascular. También se ha descrito la presencia de telómeros más cortos en células madre cardíacas de roedores viejos y menor actividad de telomerasa, por lo que también las células madre son susceptibles de presentar cambios senescentes. A medida que se envejece, los miocitos presentan telómeros más cortos, lo que confiere disminución de su actividad y el consecuente desarrollo de enfermedades cardiovasculares como hipertensión, aterosclerosis y falla cardíaca.

A nivel cardiovascular, los factores heredados se sustentan en el hecho de que descendientes sanos de pacientes con enfermedad coronaria tienen telómeros más cortos, lo que sugiere que el telómero corto puede ser causa más que consecuencia de enfermedad cardiovascular.

La relevancia en la longitud del telómero tiene que ver con que puede llevar a la senescencia replicativa celular, mediado principalmente por la proteína p53. Esta proteína se considera el guardián del genoma y es el principal sensor de daño celular que se activa en respuesta a daño al ADN y que incluye la disfunción de telómero y otros estímulos como ROS, activación de oncogenes e hipoxia. Al activarse, lleva a la célula a arresto del crecimiento y reparación o apoptosis y senescencia, de acuerdo con el grado de activación.

Otro mecanismo de envejecimiento vascular y sobrevida involucra a las Akt cinasas, proteínas involucradas aparentemente en la fosforilación de la subunidad transcriptasa reversa de la telomerasa (hTERT), induciendo su activación. Cambios en la fosforilación podrían repercutir en la actividad de la enzima y afectar la resistencia de las células endoteliales a apoptosis. Y el ON puede participar en un mecanismo de retroalimentación modulado por la actividad de Akt cinasa.

La relevancia del tamaño de telómero en células endoteliales se puede ver en las células endoteliales telomerizadas (con agrandamiento de telómero), que tienen un mayor grado de inducción y valores basales más altos de eNOS que las contrapartes parentales senescentes y responden mejor al estrés del volumen vascular que sus parentales controles no telomerizadas. Además, la transducción estable de hTERT en células endoteliales parece inducir un mecanismo vasoprotector mediado en parte por ON. Estos mecanismos explican parte de los cambios que se presentan durante el envejecimiento.

Aunque la disminución del tamaño de telómero podría considerarse marcador de senescencia y existe una clara asociación entre su longitud y el riesgo de enfermedades cardiovasculares, así como con la historia familiar de algunas de estas patologías, con tabaquismo y con aumento en la mortalidad, no es posible confirmar si el acortamiento o disfunción del telómero es origen o efecto de estas alteraciones (Sahin *et al.*, 2011; Sahin y Depinho,

2010; Breithschopf y Zeiher, 2001; Vasa *et al.*, 2000; Cech *et al.*, 1997; Brouillette *et al.*, 2008; Von Zglinicki, 2000).

### **Otros factores**

Por otro lado, actualmente se ha demostrado que la restricción calórica aumenta el periodo de vida en casi todas las especies, afectando algunas de las vías que se alteran durante el proceso normal del envejecimiento cardiovascular. Los mecanismos propuestos son que:

- Disminuye la producción de ROS
- Disminuye la expresión de genes proinflamatorios en diferentes tejidos de animales
- Disminuye el daño celular en la aorta de ratones viejos

Además de la restricción calórica, los efectos de la actividad física también afectan varias vías que median los cambios cardiovasculares asociados a la edad. Éstos se describen en la tabla 1 (Ballard y Edelberg, 2008; Seals *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2008; Yung *et al.*, 2009; Gates y Seals, 2006; Ungvari *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2000).

*Tabla 1. Efectos del ejercicio a nivel molecular en envejecimiento vascular.*

Aunque aún falta por determinar diversos factores a nivel molecular que ayuden a comprender los mecanismos que se presentan durante el envejecimiento cardiovascular, los principales son inflamación, disfunción endotelial y disfunción telomérica, además de procesos de redox. Su participación es de una manera convergente o en colaboración y no como procesos aislados (figura 4).

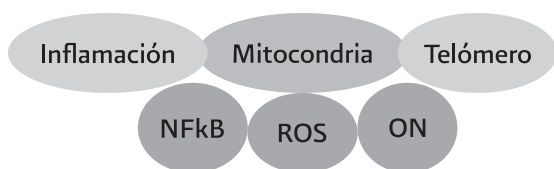


Figura 4. Procesos a diferentes niveles que se presentan conforme avanza la edad: NFkB: factor nuclear kappa B, ROS: especies reactivas de oxígeno, ON: óxido nítrico.

1. Ahlers BA. An age-related decline in endothelial function is not associated with alterations in L-arginine-transport in humans. *J Hypertens*, 2004;22(2):321-327.
2. Ballard VL, Edelberg JM. Stem cells and the regeneration of the aging cardiovascular system. *Circ Res*, 2007 Apr 27;100(8):1116-1127.
3. Ballard VL, Edelberg JM. Stem cell for cardiovascular repair-the challenges of the aging heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2008;45(4): 582-592.
4. Benetos A, Waeber B, et al. Influence of age, risk factors, and cardiovascular and renal disease on arterial stiffness: clinical applications. *Am J Hypertens*, 2002;15(12):1101-1108.
5. Blacher J, Safar ME. Large-artery stiffness, hypertension and cardiovascular risk in older patients. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2005;2(9):450-455.
6. Breitschopf K, Zeiher AM. Proatherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells

- tough an Akt-dependent mechanism. *FEBS Lett*, 2001;493(1): 21-25.
7. Brouillette SW, Whittaker A, et al. Telomere length is shorter in healthy offspring of subjects with coronary artery disease: support for the telomere hypothesis. *Heart*, 2008;94(4):422-425.
8. Camici GG, Sudano I, et al. Molecular pathways of aging and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009;18(18):134-137.
9. Cattani V, Kakou A, et al. Pathophysiology, genetic, and therapy of arterial stiffness. *Biomed Mater Eng*, 2006;16(4 Suppl):S155-161.
10. Cech TR, Nakamura TM, et al. Telomerase is a true reverse transcriptase. A review. *Biochemistry (MOsc)*, 1997;62(11):1202-1205.
11. Celermajer DS, Sorensen KE, et al. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol*, 1994;24:471-476.
12. Chung HY, Cesari M, et al. Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age related disease. *Ageing Res Rev*, 2009;8(1):18-30.
13. Chernyak BV. Redox regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Biosci Rep*, 1997;17(3):293-302.
14. Csiszar A, Wang M, et al. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kB. *J Appl Physiol*, 2008;105(4):1333-1341.
15. Csiszar A, Pacher P, et al. Role of oxidative and nitrosative stress, longevity genes and poly(ADP-ribose) polymerase in cardiovascular dysfunction associated with aging. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005;3(3):285-291.
16. Darley-Usmar V, Wiseman H, et al. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett*, 1995;7:369(2-3):131-135.
17. De Meyer T, Rietzschel ER, et al. Telomere length and cardiovascular aging: The means to the ends? *Ageing Res Rev*, 2011;10(2):297-303.
18. De Souza CA, Aspira LF, et al. Regular aerobic exercise prevents and restore age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation*, 2000;102:1351-1357.
19. Díez J. Arterial stiffness and extracellular matrix. *Adv Cardiol*, 2007;44:76-95.
20. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the



- rol of permeability transition. *Cardiovasc Res*, 2005;66(2):222-232.
21. Donato AJ, Black AD, et al. Aging is associated with greater NFκB, reduced IKBα and increased expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells of healthy humans. *Aging Cell*, 2008;7(6):805-812.
  22. Donato AJ, Pierce GL, et al. Role of NFκB in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. *Aging*, 2009;1(8):678-680.
  23. Donato AJ, Eskursa I, et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans; relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Cir Res*, 2007;100:1659-1666.
  24. Eskurza I, Myerburgh LA, et al. Tetrahydrobiopterin augments endothelium-dependent dilation in sedentary but not in habitually exercising older adults. *J Physiol*, 2005;568:1057-1065.
  25. Farsetti A, Grasselli A, et al. The telomerase tale in vascular aging: regulation by estrogens and nitric oxide signaling. *J Appl Physiol*, 2009;106(1):333-337.
  26. Fleenor BS, Marshall KD, et al. Arterial stiffening is associated with transforming growth factor-1-related changes in adventitial collagen reversal by aerobic exercise. *J Physiol*, 2010;588(Pt 20):3971-3982.
  27. Gates PE, Seals D. Decline in large elastic artery compliance with age: a therapeutic target for habitual exercise. *Br J Sports Med*, 2006;40(11): 897-899.
  28. Goel A, Su B, Flavahan S, et al. Increased endothelial exocytosis and generation of endothelin-1 contributes to constriction of aged arteries. *Circ Res*, 2010 Jul 23;107(2):242-251.
  29. Hae-Young L, Byung-Hee O. Aging and Arterial Stiffness. *Circ J*, 2010; 74:2257-2262.
  30. Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry, *J Gerontol*, 1956;298-300.
  31. Ivashchenko O, Van Veldhoven P, et al. Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: oxidative stress and interorganellar crosstalk. *Mol Biol Cell*, 2011;22(9):1440-1451.
  32. Judge S, Leeuwenburgh C. Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress and aging. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007;292(6):C1983-1992.
  33. Kang LS, Reyes RA, et al. Aging impairs flow-induced dilation in coronary arterioles: role of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009;297(3):H1087-1095.
  34. Kim JH, Bugaj LJ, et al. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J Appl Physiol*, 2009;107(4):1249-1257.
  35. Kovacic JC, Moreno P, et al. Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 1 of a 2-part review. *Circulation*, 2011;123(15):1650-1660
  36. Kovacic JC, Moreno P, et al. Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 2 of a 2-part review: clinical vascular disease in the elderly. *Circulation*, 2011;123(17):1900-1910.
  37. Kurz DJ, Decary S, et al. Chronic oxidative stress comprises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Science*, 2004;117(Pt11):2417-2426.
  38. Lakkata EG. Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises: part III: Cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation*, 2003;107(3):490-497.
  39. Leung FP, Yung LM, et al. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (Part 1). *Sports Med*, 2008;38(12):1009-1024.
  40. Maruyama Y. Aging and arterial-cardiac interactions in the elderly. *Int J Cardiol*, 2011;doi:10.1016.
  41. Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Cir Res*, 2007;100(1):15-26.
  42. Ramasamy R, Vannucci SJ, et al. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*, 2005;15(7):16R-28R.
  43. Sahin E, Colla S, et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*, 2011;470:359-365.
  44. Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondrial and stem cell during ageing. *Nature*, 2010(7288);520-528.
  45. Saliques S, Zeller M, et al. Telomere length and cardiovascular disease. *Arch Cardiovasc Dis*, 2010;103(8-9):454-459.
  46. Santhanam L, Lim HK, et al. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Cir Res*, 2007;101(7):692-702.

47. Santhanam L, Christianson DW, et al. Arginase and vascular aging. *J Appl Physiol*, 2008;105(5):1632-1642.
48. Sawabe M. Vascular aging: From molecular mechanism to clinical significance. *Geriatr Gerontol Int*, 2010;10(S1):S213-S220.
49. Seals DR, Walker AE, et al. Habitual exercise and vascular ageing. *J Physiol*, 2009;587(Pt23):5541-5549.
50. Taddei S, Virdis A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation*, 1995;91:1981-1987.
51. Taddei S, Virdis A. Age related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension*, 2001;38:274-279.
52. Tokunaga O, Fan J, et al. Endothelin. Immunohistologic localization in aorta and biosynthesis by cultured human aortic endothelial cells. *Lab Invest*, 1992;67:210-217.
53. Ungvari Z, Kaley G, et al. Mechanism of vascular aging: New perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010;65A(10):1028-1041.
54. Van Guilder GP, Westby CM, et al. Endothelin-1 vasoconstrictor increases with age in healthy men but can be reduced by regular aerobic exercise. *Hypertension*, 2007;50:403-409.
55. Vasa M, Breitschopf K, et al. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Cir Res*, 2000;29:87(7): 540-542.
56. Versari D, Daghini E, et al. The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man. *Exp Physiol*, 2009;94(3):317-321.
57. Versari D, Daghini E, et al. The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man. *Experimental Physiology*, 2009;94:317-321.
58. Von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci*, 2000;908:99-110.
59. Wang X, Keith JC Jr, et al. Assessment of arterial stiffness, a translational medicine biomarker system for evaluation of vascular risk. *Cardiovasc Ther*, 2008;26(3):214-223.
60. Wilson WR, Herbert KE, et al. Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J*, 2008;29(21):2689-2694.
61. Wu M, Fannin J, et al. Effect of aging on cellular mechanotransduction. *Ageing Res Rev*, 2011;10(1):1-15.
62. Yasmin, O'Shaughnessy KM. Genetics of arterial structure and function: towards new biomarkers for aortic stiffness? *Clin Sci*, 2008;114(11):661-677.
63. Yung LM, Laher I, Yao X, et al. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (part 2). *Sports Med*, 2009;39(1):45-63.

### **María del Carmen Palacios Reyes**

Egresada de la carrera de Medicina de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA); realizó la especialidad en Genética Médica con sede en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y la maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular en el Instituto Politécnico Nacional. Actualmente, se encuentra en el proyecto de doctorado en Investigación en Medicina. Su trabajo se ha desarrollado en el área de genética clínica y los aspectos moleculares del retraso mental.

**Carmen Ríos**

Instituto Barshop para Estudios de Envejecimiento  
y Longevidad.

Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad  
de Texas en San Antonio, UTHSCSA, Estados  
Unidos.

RiosC3@uthscsa.edu

a sarcopenia se define como la pérdida de la masa y de la función muscular asociada a la edad. El decremento en la fuerza, en la tasa metabólica y en la funcionalidad del músculo conllevan a un deterioro en la calidad de vida.

Se ha sugerido que durante el establecimiento de la atrofia muscular en el envejecimiento, el estrés oxidante generado por la mitocondria juega un papel predominante. Al mismo tiempo, existe una regulación muy fina entre el número, la calidad y la funcionalidad de las mitocondrias, con la pérdida y la atrofia de la masa muscular.

Otro factor muy importante durante la sarcopenia es el proceso inflamatorio y su relación con la disfunción mitocondrial y la muerte celular, por lo que en este capítulo se tratarán algunos de los conceptos que se están manejando actualmente para entender la problemática de la sarcopenia, así como algunas intervenciones que se han realizado para su prevención.

La sarcopenia es un término clínico que se define como la pérdida de la masa y de la función muscular asociada a la edad. En humanos, el decremento en la fuerza, en la tasa metabólica y en la funcionalidad del músculo conllevan a un deterioro en la calidad de vida.

Se han propuesto diversas hipótesis para tratar de explicar que es lo que desencadena el deterioro progresivo; entre ellas se encuentran la disfunción mitocondrial, las alteraciones en la señalización de la apoptosis y la autofagia, así como una menor capacidad en la regeneración celular y en la innervación funcional (Jang y Van Remmen, 2010). Puesto que existe evidencia experimental que soporta todas estas ideas, se ha pensado en un mecanismo global que relacione dichos aspectos.

Este capítulo provee una revisión amplia relacionada a la pérdida de la masa muscular durante el envejecimiento, así como una discusión de algunos de los mecanismos por los cuales el organismo intenta reparar el daño de manera natural y de ciertas intervenciones terapéuticas que se han empleado para detener o revertir los eventos que conducen a la sarcopenia.

## **Estrés oxidante e inflamación en el envejecimiento muscular**

### ***Estrés oxidante***

Dos factores que juegan un papel preponderante en la atrofia muscular durante el envejecimiento son el estrés oxidante y el proceso inflamatorio. Ambos factores pueden interferir con el balance entre la síntesis y la degradación de las proteínas que causan disfunción mitocondrial e inducen apoptosis.

El estrés oxidante ocurre cuando hay una disparidad entre el nivel de especies oxidantes generadas y el de especies antioxidantes disponibles para remover a las primeras. Durante el envejecimiento, existe un incremento en los niveles oxidantes en el músculo esquelético en reposo, lo que se ha asociado a la inducción de la atrofia muscular debido al desuso (Siu, 2008). Asimismo, el estrés oxidante es importante en una gran cantidad de enfermedades crónicas que vienen acompañadas de pérdida muscular (Moylean, 2007).

En condiciones normales, las proteínas de músculo esquelético son sintetizadas y degradadas en función de las necesidades celulares, sin embargo, durante el envejecimiento, cuando el estrés oxidante está incrementado, el balance proteico o proteostasis se debilita (véase capítulo: Mecanismos de degradación de proteínas en el envejecimiento). Este desbalance pone de manifiesto una señalización molecular defectuosa, lo cual caracteriza la compleja patogénesis de la sarcopenia e implica factores moleculares que se comunican a través de vías involucradas con estrés oxidante, inflamación, cambios endocrinos, inactividad y nutrición, algunos de los cuales están representados en la figura 1.

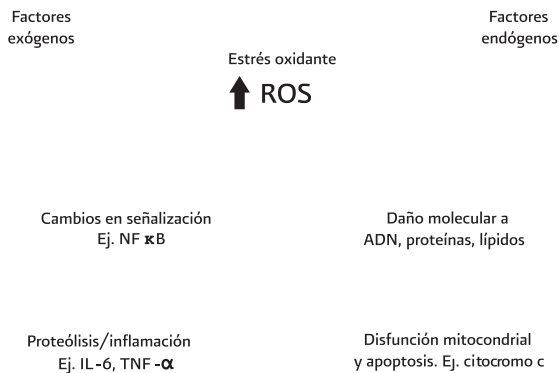
### ***Inflamación***

Las condiciones crónicas como la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, la resistencia a la insulina y la artritis están relacionadas con el proceso inflamatorio y, al mismo tiempo, se han asociado con el envejecimiento. Investigaciones recientes sugieren que la sarcopenia puede surgir de un estado crónico de inflamación de bajo grado, influenciado por la producción de citocinas y estrés oxidante (Jensen, 2008). El factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) es un factor sensible a cambios en el estado redox que modula las respuestas inmunológicas, de supervivencia

celular y proliferación, así como inflamatorias, y se ha visto que tiene una participación importante durante el envejecimiento (Piette, 1997). De manera que con el aumento de la edad, se ha encontrado una sobrerregulación en algunos mediadores de inflamación como el factor NF- $\kappa$ B antes mencionado, así como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Chung, 2009). Aunado a ello, las especies reactivas de oxígeno (ROS) también funcionan como segundos mensajeros para TNF- $\alpha$  en músculo esquelético activando a NF- $\kappa$ B (Reid, 2001).

### Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las ROS como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) son generados en los organismos aeróbicos continuamente por una gran variedad de vías (Fridovich, 1978). Al ser la mitocondria una de las fuentes principales de ROS, este organelo se ha postulado como un participante fundamental durante la atrofia muscular.



## SARCOPENIA

Figura 1. Mecanismos de estrés oxidante durante la sarcopenia. Adaptado de Meng y Yu, 2010. El modelo propone los mecanismos por los cuales el estrés oxidante y la inflamación crónica pueden llevar a la sarcopenia. Las vías afectadas están relacionadas con un desbalance en la síntesis de proteínas y su degradación, así como con la disfunción mitocondrial y la apoptosis.

Se sabe que en el ratón existe un incremento dramático en la generación de ERO mitocondriales en el músculo durante

el envejecimiento y en asociación con las enfermedades neurodegenerativas. De hecho, la generación de ERO es casi tres veces mayor en ratones viejos (28 a 32 meses de edad), en comparación con los jóvenes (10 meses de edad) y esto se ha asociado a una pérdida de 30% del músculo gastrocnemio (Muller, 2007).

Sin embargo, también hay que considerar a las ROS generadas por la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (Babior, 1978), además de que varios factores medioambientales como la radiación ionizante y no-ionizante (Girotti, 1998) y algunos compuestos patológicos como el  $\beta$ -amiloides en la enfermedad de Alzheimer, pueden llevar también a la formación de ROS (Tabner *et al.*, 2005). Las ROS pueden ser dañinas, pero a la vez son requeridas para la señalización normal de una célula, pero en grandes cantidades pueden llegar a dañar biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN (Valko *et al.*, 2006). Los ácidos grasos poliinsaturados dentro de las membranas son especialmente vulnerables a la oxidación (peroxidación), de modo que los peroxirradicales, generados por la lipoperoxidación, pueden desencadenar una reacción en cadena que oxida a otros ácidos grasos (Halliwell *et al.*, 1999). Los productos finales de la lipoperoxidación son aldehídos reactivos como el 4-hidroxinonanal (4-HNE) y el malondialdehído (MDA), los cuales son altamente tóxicos para las células. Estos aldehídos reactivos pueden atacar otros blancos celulares como proteínas y ADN, por lo que el daño inicial a las membranas lipídicas puede ser propagado a otras macromoléculas. Asimismo, la lipoperoxidación tiene un efecto dañino sobre la fluidez de la membrana y la función de las proteínas que en ella se encuentran (Richter, 1987). La continua oxidación de los ácidos grasos y la producción de aldehídos eventualmente conllevan a la pérdida de la integridad de la membrana (Halliwell *et al.*, 1999). La acumulación del daño al ADN tanto nuclear, como mitocondrial, eventualmente compromete la integridad de la célula, llevando a la pérdida de miocitos y, por tanto, a la pérdida del músculo.

### Efecto del estrés oxidante sobre la función mitocondrial

Como se mencionó, las mitocondrias son la fuente principal en la generación de las ROS, pero al mismo tiempo son un blanco sensible para los efectos nocivos del estrés oxidante).

La lipoperoxidación puede entorpecer la función mitocondrial primordial, es decir, la respiración mitocondrial y la producción de ATP. La fosforilación oxidativa se lleva a cabo en los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), localizados en la membrana interna de este organelo. De este modo, un electrón es transferido desde el NADH o FADH<sub>2</sub> al oxígeno molecular y de manera simultánea con la generación de un gradiente de protones, lo cual posteriormente induce la síntesis de ATP por la enzima ATPsintasa (véase capítulo: Mitocondria y envejecimiento en este mismo libro). Este proceso es altamente susceptible al estrés oxidante y puede llegar a inhibir la síntesis de ATP. Por lo tanto, la importancia de la mitocondria en la disfunción relacionada al envejecimiento incluye la pérdida en la producción de ATP, pero también la activación de vías de señalización que inician el proceso irreversible de daño a las mitocondrias del músculo (Marzetti, 2008).

### **Apoptosis**

Estudios recientes sugieren que la apoptosis es un mecanismo que podría fomentar el envejecimiento y la pérdida muscular asociada a él (Leeuwenburgh, 2003). La apoptosis es un proceso altamente regulado que conlleva a la muerte celular y se caracteriza por una serie de eventos morfológicos, bioquímicos y moleculares específicos. Algunos factores que pueden desencadenar la apoptosis en el músculo durante el envejecimiento son el aumento en el calcio, el estrés oxidante y el TNF- $\alpha$  (Nitahara, 1998; Cadenas, 2000). Datos recientes sugieren que la sarcopenia se asocia con un incremento en la producción de ROS, un aumento en la susceptibilidad mitocondrial a la apoptosis y una reducida biogénesis mitocondrial.

Durante la vía mitocondrial de la apoptosis, y como respuesta a los elevados niveles de calcio, daño al ADN, alteraciones en la CRM y estrés oxidante, el citocromo c puede ser liberado de la mitocondria al citosol iniciando el proceso de apoptosis. El citocromo c induce la formación del apoptosoma junto con Apaf-1 y la procaspasa 9, activando de esta manera a la procaspasa 3. La caspasa 3 activa es, a su vez, la responsable de la ejecución de la muerte apoptótica.

La cardiolipina (CL), un componente crítico de la membrana interna mitocondrial que conforma aproximadamente 20% de la composición lipídica total, también participa en

la vía apoptótica. La estructura fosfolipídica inusual de la CL es especialmente susceptible al estrés oxidante debido a su alto contenido en ácidos grasos insaturados (Giresi, 2005). En condiciones fisiológicas normales, el citocromo c se une a la CL gracias a interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que median las funciones necesarias durante el metabolismo energético. No obstante, la peroxidación de la CL da como resultado la disociación del complejo citocromo c-CL y, subsecuentemente, favorece la liberación del citocromo c al citosol iniciando la apoptosis (Siu, 2008; Moylan, 2007).

### **Células satélite y regeneración muscular**

El entendimiento de los mecanismos que conllevan a la sarcopenia es crucial en el desarrollo de los tratamientos para detener o prevenir la pérdida muscular. Para ello, sin embargo, primero debe analizarse cómo ocurre la reparación del tejido de manera natural en las células. Con este conocimiento se lograrán desarrollar terapias efectivas para el paciente mayor.

El músculo esquelético es un tejido dinámico y adaptable al cambio en función de las demandas del cuerpo humano. Para lograr mantener la homeostasis, el músculo esquelético debe regenerarse de manera constante y continua. La población de células musculares progenitoras que orquesta este acto se conocen como células satélite (CS).

Las CS de músculo son un subgrupo de células madre adultas (*adult stem cells*) localizadas entre la membrana plasmática de la miofibra y la lámina basal del tejido muscular. Fueron inicialmente identificadas en músculo de rana por microscopía electrónica (Mauro *et al.*, 1961; Collins *et al.*, 2005) y son capaces de llevar a cabo divisiones celulares tanto simétricas como asimétricas, además de autorenovación y diferenciación, como otros tipos de células madre adultas y células madre embrionarias. Los mioblastos quiescentes o "latentes" se encuentran en el músculo esquelético de todos los vertebrados desde los murciélagos hasta los ratones (Hawke *et al.*, 2001; Mauro, 1961), en donde esperan la señal para responder formando nuevo músculo cuando es necesario. Este tipo de células se consideran quiescentes o transcripcionalmente poco activas, porque contienen más heterocromatina nuclear en comparación con los mionúcleos eucromáticos (Hawke *et al.*, 2001; Muir *et*

*al.*, 1965). Las CS salen del estado quiescente cuando reciben las señales que disparan la diferenciación. Estas células pueden responder iniciando la proliferación, de manera que se incremente la poza de células progenitoras. A su vez, estas células generarán los mioblastos que, de manera terminal, se diferenciarán al fusionarse unos con otros y formarán nuevo músculo, o bien, se unirán a fibras dañadas para reparar las ya existentes.

Una porción de CS no pretende alcanzar la diferenciación terminal, sino que se mantiene en un estado primitivo y continúa con la autorenovación, de manera que se siga manteniendo una poza de células madre que pueda volverse a activar frente a futuras demandas. Como resultado, debe existir una interacción estratégica entre las vías moleculares de señales que dictan si las CS se mantienen en un estado a través de la autorenovación, o bien, continúan su camino hacia células progenitoras que eventualmente se diferenciarán en músculo. Por ello resulta evidente que los cambios en la señalización impactarán el resultado del programa de diferenciación, así como el proceso del envejecimiento.

Se sabe que la población de CS es dependiente de la edad, así como de la especie y del tipo de miofibra. En ratones neonatos es posible encontrar aproximadamente 30% de núcleos musculares, mientras que solo 2-4% en ratones adultos (Hawke *et al.*, 2001); aunque no se ha encontrado un decremento significativo en el número total de CS ni en ratón ni en humano (Conboy *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 2000; Wagers *et al.*, 2005). Las CS aisladas de donadores humanos jóvenes y viejos (9 años contra  $\geq 60$ ) mantuvieron su potencial proliferativo casi constante. La CS fueron capaces de llegar a 20-30 replicaciones *in vitro* (Hawke *et al.*, 2001; Renault *et al.*, 2000). Las CS de ratón aisladas de animales jóvenes (3-6 meses), adultos (7-10 y 11-13 meses), maduros (19-25 meses) y viejos (29-33 meses) mantuvieron la misma capacidad proliferativa *in vitro*, siempre y cuando se les suministrara un medio apropiado enriquecido con FGF (Shefer *et al.*, 2006). Un subconjunto de CS de animales viejos (22-30 meses) han mostrado ser capaces de autorenovación y regeneración de tejido en comparación con células de animales jóvenes *in vitro* y después de injerto de miofibras (Collins *et al.*, 2007). Por otro lado, Bortoli *et al.* demostraron que los perfiles de expresión en las CS varía con la edad del donador. Este

grupo observó una sobrerregulación en genes involucrados en la estructura y la diferenciación muscular, además de genes del metabolismo de los neonatos en los donadores más jóvenes en comparación con una disminución en la regulación (*down-regulation*) de los genes responsables de la renovación de proteínas en los adultos. Los mioblastos aislados de personas donadoras de diferentes edades (5 días, 52 años y 79 años) mostraron cambios muy marcados en la expresión de genes entre la etapa de proliferación y la llegada a la senescencia celular (Bortoli *et al.*, 2003). Los cambios en la expresión genética son controlados por señales moleculares recibidas por las CS en el microambiente muscular y pueden ser permanentes o temporales. A su vez, las señales extrínsecas permiten que existan alteraciones en la señalización intrínseca de las células. La relación de las células y su microambiente es íntima y necesaria para mantener la población original de células preparadas para responder a las necesidades regenerativas del organismo en cualquier momento. Aunque aún no se ha establecido un perfil molecular exacto para las CS, se ha reportado la expresión de moléculas como CD34, Pax7,  $\beta$  1-integrina y CXCR4, (marcadores de células madre) y una carencia en CD45, Sca 1 y Mac1. Una vez activadas, las CS continúan expresando Pax7,  $\beta$  1-integrina y CXCR4, y comienzan a expresar desmina, Myf-5 y MyoD, marcadores reconocidos del linaje muscular (Collins *et al.*, 2007; Cossu *et al.*, 2007; Mitchell *et al.*, 2005; Sherwood *et al.*, 2004; Wagers *et al.*, 2005). Basado en experimentos de trasplantes, se sabe que las subpoblaciones de CS son heterogéneas y poseen diferente potencial biogénico. Esta heterogeneidad ha dificultado establecer una lista única de marcadores miogénicos, aceptada por toda la comunidad científica.

El microambiente de las CS provee un nicho especializado que dirige todas las señales que controlan la quiescencia, coordinan la proliferación celular para mantener la poza de células madre y, al mismo tiempo, preservan las propiedades de autorenovación y la capacidad de diferenciarse en tejido muscular esquelético totalmente funcional.

La comunicación entre las CS y su nicho aparentemente está regulada por vías de señalización evolutivamente conservadas como Notch, Wnt, TGF- $\beta$ , Shh y Ras/MAPK (Carlson *et al.*, 2008; Wagers *et al.*, 2005). Se sabe que estas vías controlan la homeostasis tisular. Las

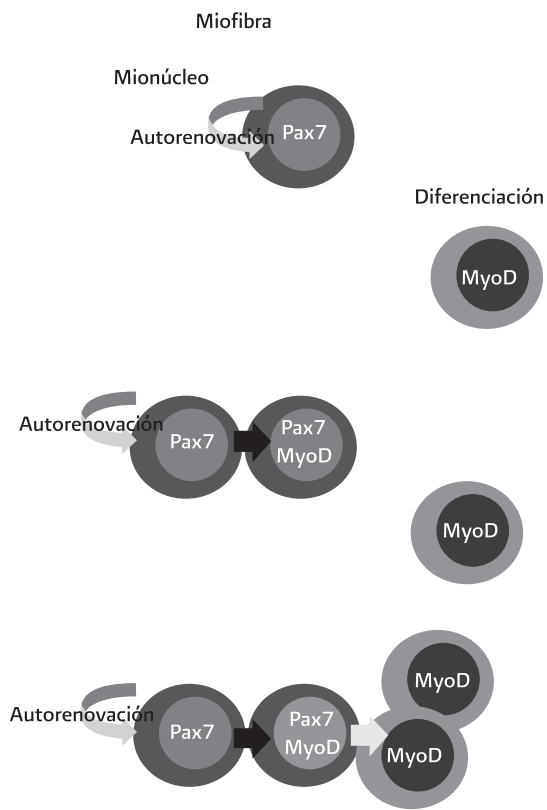


Figura 2. Relación entre Pax 7 y MyoD durante al autorenovación y diferenciación de las células satélite. Las CS quiescentes (Pax7+) activan y coexpresan a Pax7 y MyoD. Las células MyoD+ proliferan y disminuyen la regulación de Pax7, iniciando la terminación diferencial. Las células Pax 7+ son capaces de mantener la poza de CS y proveer células que tomen el camino de diferenciación simultáneamente a través de divisiones celulares asimétricas. La señalización extrínseca e intrínseca del microambiente de las miofibras dicta el destino de las CS.

más notables son las vías de Notch y Wnt, que han sido implicadas en el envejecimiento prematuro, como el que se observa durante la progeria (Espada *et al.*, 2008; Scaffidi y Misteli, 2008). De manera específica en el músculo, se ha demostrado que el deterioro en la vía canónica de señalización de Wnt durante el envejecimiento afecta la regulación y el destino de las células madre en dicho tejido. En un estudio de Brack y colaboradores se observó que el potencial regenerativo del músculo esquelético declinaba con la edad y que esta discapacidad se encontraba asociada al incremento en la fibrosis del tejido. Ello se encontraba mediado por factores en el medio ambiente sistémico de los animales viejos causantes de una sobreexpresión

de la vía de señalización de Wnt (Brack *et al.*, 2007). Asimismo, el grupo de Carlson encontró que aun cuando la presencia de CS se mantiene en el músculo esquelético humano envejecido, dichas células no son capaces de activarse en respuesta a la pérdida muscular.

También encontraron que se disminuía la activación de Notch debido a un incremento en el factor de crecimiento transformante beta y la fosforilación de Smad 3 (TGF-beta/pSmad3). Este trabajo reveló que la señalización de la cinasa activada por mitógeno (MAPK) y que la cinasa de regulación extracelular (ERK) declinan en el músculo humano con la edad, lo cual es crucial para la activación de la vía Notch. En este estudio, indujeron la activación de MAPK/Notch, lo cual logró restaurar respuestas mitogénicas “juveniles” en CS de humanos de 70 años, haciéndolas similares a las células de humanos de 20 años (Carlson *et al.*, 2009).

La señalización molecular aparentemente se altera con la edad y, en este caso, probablemente se deba a la acumulación de cambios en el microambiente de las CS. La señalización alterada conlleva la nula o ineficiente reparación en el músculo, por lo que se va creando un tejido muscular de una “calidad inferior” que contiene una gran cantidad de tejido fibroso y graso, lo cual a su vez afecta tanto a la estructura como a la función (Brack *et al.*, 2007; Marshall *et al.*, 1989). El fallo o alteración en estas redes de señalización dentro del tejido muscular, como se ha descrito, es aparentemente el responsable de la reparación ineficiente del músculo, lo cual resulta en la pérdida muscular, es decir la sarcopenia (Carlson *et al.*, 1989; Billington *et al.*, 1996, Gopinath *et al.*, 2008).

A un nivel subcelular, es la mitocondria la que posee una posición de valor extremo cuando se habla del bienestar general de la célula, por lo que a continuación se describirá cómo este organelo juega un papel clave en la homeostasis celular y tisular del músculo.

**Biogénesis mitocondrial**

Como se ha mencionado, las mitocondrias son los organelos generadores de energía y, al mismo tiempo, son orquestadoras de múltiples cascadas de señalización. Mediante la fosforilación oxidativa utilizan el poder del oxígeno para sintetizar energía en forma de ATP, sin el cual las células no sobrevivirían. Aun cuando las mitocondrias



tienen su propio ADN y mantienen ciertas características “autónomas” a raíz de su origen endosimbiótico, ahora se sabe que existe una relación íntima que involucra un continuo flujo de señalización entre la mitocondria y el núcleo que, de ser alterado, impacta el metabolismo, el control del ciclo celular, el desarrollo e incluso la muerte celular (McBride *et al.*, 2006). Las alteraciones en la señalización celular asociadas al envejecimiento se han relacionado con la aparición de enfermedades que presentan disfunciones mitocondriales. La regulación normal de la homeostasis proteica se ve severamente comprometida debido al estrés generado por la acumulación de ROS y de mutaciones en el genoma mitocondrial durante la replicación con el paso del tiempo. La regulación en el plegamiento dentro del ambiente mitocondrial es solo una función esencial para mantener un eficiente rendimiento energético por la mitocondria. Para preservar la función durante la biogénesis, remodelación y estrés, las proteínas mitocondriales son monitoreadas por chaperones moleculares y por proteasas. La desregulación de cualquiera de estos componentes clave lesiona este delicado balance (Baker y Haynes, 2011).

Se sabe que la señalización que dirige la biogénesis mitocondrial involucra a (PGC)-1 $\alpha$  y su receptor (PPAR)- $\gamma$ . (PGC)-1 $\alpha$  es un coactivador transcripcional que interactúa con diversos factores de transcripción involucrados en una variedad de respuestas biológicas, entre las que se encuentra la biogénesis mitocondrial, el metabolismo de los azúcares y ácidos grasos, la transformación a fibras especializadas en el músculo esquelético y desarrollo del corazón. El aumento en PGC-1 $\alpha$  induce la transcripción del factor nuclear respiratorio NRF2, conllevando a un incremento en la expresión del factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA), así como de otras subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial codificadas en el genoma nuclear, como la ATP sintasa-beta, citocromo c y la subunidad IV de la citocromo c oxidasa. El factor mtTFA se transloca a la mitocondria, en donde estimula la replicación del ADN mitocondrial y la expresión de genes, ambos eventos necesarios para la biogénesis mitocondrial (Liang y Ward, 2006).

El incremento en la biogénesis mitocondrial y en el metabolismo oxidativo marca el comienzo del desarrollo del corazón de ratón, mediante un aumento robusto en la expresión de PGC-1 $\alpha$ , en particular por la oxidación de

ácidos grasos por la mitocondria, lo cual es importante durante el nacimiento. Resulta interesante que el ayuno no prolongado también produce un incremento en la oxidación de ácidos grasos mitocondriales activando también la PGC-1 $\alpha$  del miocardio (Lehman *et al.*, 2000). Sin embargo, ¿qué sucede cuando el sistema se encuentra alterado, enfermo o durante el envejecimiento?

Impedimentos energéticos relacionados con la mitocondria, como los que se observan en la enfermedad de Huntington (EH), se han relacionado con una señalización aberrante de PGC-1 $\alpha$  / PPAR- $\gamma$ . Durante la EH se han encontrado anomalías en la morfología mitocondrial, pérdida del potencial de membrana y aberraciones en el ADN de este organelo, en tejidos como cerebro y músculo de pacientes, por lo que se ha establecido una liga directa entre la disfunción mitocondrial y esta enfermedad neurodegenerativa (Jin y Johnson, 2010). Se sabe que parte del deterioro asociado a la edad está relacionado con el acortamiento de los telómeros.

Éstos cubren los extremos de los cromosomas protegiéndolos del daño al ADN; cuando las células llegan al límite de divisiones celulares viables, los telómeros se acortan y pierden su estructura, vulnerando los extremos de los cromosomas. Un estudio reciente ha revelado que la disfunción telomérica activa la detención del ciclo celular mediada por p53, así como la senescencia y la apoptosis, lo que conlleva a la atrofia progresiva y al quebranto funcional en tejidos con alto recambio como el músculo. Resultando a la larga en la falla del órgano. La activación de p53 reprime las funciones tanto de PGC1- $\alpha$  como de su coactivador, PGC1- $\beta$ , que trabajan juntos para mantener la densidad mitocondrial y su capacidad funcional. Este estudio relaciona el deterioro asociado al envejecimiento con la represión de la biogénesis mitocondrial; dicha secuencia de eventos pone en marcha una ola de destrucción que reduce la salud y la longevidad (Sahin, *et al.*, 2011).

### **Intervención**

Se ha mencionado que, de manera natural, se pierde la habilidad para mantener mitocondrias viables con la edad, por lo que surge la pregunta: ¿habrá algo que se pueda hacer para detener este quebranto? La respuesta es sí.

Se ha demostrado que un estilo de vida activo se

**Acortamiento de telómeros****p53****PGC****Cambios metabólicos/  
disfunción mitocondrial****Envejecimiento/  
enfermedad**

*Figura 3. Modelo de la disfunción mitocondrial y su relación con las enfermedades y el envejecimiento. Adaptado de Sahin et al., 2011 y de Liang y Ward, 2006. Una reducción en la elongación de los telómeros estimula la expresión de p53. Subsecuentemente, se detiene la proliferación celular, por lo que se promueve la senescencia y la apoptosis. La vía clave que involucra a PGC para la funcionalidad y biogénesis mitocondrial adecuada se interrumpe, por lo que se reduce la capacidad de generar energía. A la larga, la integridad del tejido declina llevando a la enfermedad.*

encuentra directamente asociado con una preservación parcial de la biogénesis mitocondrial. Un estudio por Safdar y colaboradores reveló que al incrementar la actividad física se mejora la capacidad antioxidante en el músculo esquelético de adultos mayores. Asimismo, un estilo de vida sedentario se asocia con una reducida función mitocondrial, desregulación en el estado redox e inflamación sistémica crónica en pacientes de la misma edad. El microambiente intracelular del músculo esquelético se vuelve hiperpropenso a la toxicidad mediada por las ROS en los adultos sedentarios. Por lo anterior, el consenso general es que un estilo de vida activo es un factor importante que determina la calidad de vida y la progresión del deterioro durante el envejecimiento, de manera que la simple y viable intervención de incrementar la actividad física puede atenuar y/o revertir el deterioro del

músculo esquelético y las anomalías mitocondriales (Safdar et al., 2010).

Otro aspecto que se ha discutido es si el ejercicio debe combinarse con terapia antioxidante o antiinflamatoria. Si se considera que el crecimiento y la capacidad de las moléculas declinan en el músculo durante el envejecimiento debido al efecto del estrés oxidativo y la inflamación crónica, entonces, este tipo de intervención parece ser necesaria. Se ha demostrado que la restricción calórica retarda el deterioro en el músculo esquelético (Carter, 2007). La restricción calórica a largo plazo atenúa la elevación de ROS asociada a la edad y el daño oxidante sobre el ADN mitocondrial (Leeuwenburgh, 1997). Una dieta restringida de 40% en la ingesta de calorías durante toda la vida da como resultado una disminución significativa en la tasa de pérdida de masa muscular y atenúa la pérdida de fibras musculares inducida por la edad (McKiernan, 2004). Investigaciones recientes han demostrado que la combinación de la rueda para correr con una restricción calórica moderada preservan significativamente un mayor cociente de masa muscular/masa corporal, así como fibras musculares y una mitigación del estrés oxidante, lo cual no se encontró con el sólo tratamiento de restricción calórica (Kim, 2008). Estos hallazgos sugieren que, para la prevención a largo plazo de la pérdida muscular, se debe fomentar la restricción calórica moderada y el ejercicio diario durante toda la vida del individuo.

Sin embargo, aun cuando la actividad física y una dieta sana pueden mejorar la calidad de vida con la edad, la clave puede residir en el origen mismo de la producción del tejido. La reducida capacidad para regenerar los tejidos u órganos dañados y una propensión a las infecciones y cáncer son probablemente las marcas que caracterizan a la vejez (Hayflick, 1994). Las células madre son células originales que generan en el embrión todos los tejidos necesarios para la vida y que en el adulto permanecen guardadas, como un tesoro en una caja, dentro de los tejidos (el nicho de las células madre) hasta que son requeridas para sustituir a las células viejas y dañadas. El entendimiento de los mecanismos moleculares que permiten a las células madre la autorenovación dentro de su nicho, el dividirse, proliferar y diferenciarse a tejido nuevo durante la vida del organismo, podría ser la clave para la medicina regenerativa y una cura potencial para muchas enfermedades asociadas con el envejecimiento.

El concepto de célula madre se introdujo hace más de un siglo por Alexander Maximow (Maximow, 1909), sin embargo, la investigación de las mismas empezó apenas en 1963, cuando James Till, Ernest McCullough y Lou Siminovitch desarrollaron los medios para detectar las células madre hematopoyéticas (Siminovitch *et al.*, 1963). El descubrimiento y la identificación de las CS en músculo esquelético y la idea de que fueran las responsables de la regeneración muscular suscitó expectativas respecto al potencial para desarrollar maneras de regresar el reloj biológico (Mauro, 1961). En el campo del trasplante de células madre, Hall y colaboradores (2010) demostraron que la inducción de un daño muscular junto con el injerto de CS asociadas a miofibras (células madre de músculo esquelético), estimulan los cambios que se dan en el microambiente de los hospederos adultos jóvenes, de manera que provoca una mejora de por vida en la masa muscular, la función y el mantenimiento de la poza de células madre musculares, así como un incremento en la capacidad regenerativa del músculo.

Mientras que las CS son ideales para terapias de ingeniería de tejidos que pueden impactar en el deterioro muscular asociado a la edad, las células madre no reparan los tejidos debido a su capacidad para diferenciarse (Phinney y Prockopf, 2007). En este sentido, las observaciones actuales se han enfocado en el efecto paracrino de las células madre, conocidas por secretar grandes cantidades de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, que son tanto inmunomoduladores como tróficos. En teoría, si se pudieran aprovechar las señales moleculares necesarias para el mantenimiento de la viabilidad de las células madre, potencialmente se podría tener una terapia antienvjecimiento. Sin embargo, por ahora, mantenerse activo y consumir una dieta balanceada parece ser la mejor opción para envejecer saludablemente.

### **Agradecimientos**

Agradezco a Si-Eun Yoo, University of Texas Health Science Center, por sus contribuciones a este texto.

1. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med*, 1978;298:659-668.
2. Billington L, Carlson BM. The recovery of long-term denervated rat muscles after Marcaine treatment and grafting. *J Neurol Sci*, 1996;144: 147-155.
3. Bortoli S, Renault V, Eveno E, Auffray C, Butler-Browne G, Piétu G. Gene expression profiling of human satellite cells during muscular aging using cDNA arrays. *Gene*, 2003;321:145-54. Erratum in: *Gene*, 2004 Mar 31;329:205.
4. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad Biol Med*, 2000;29: 222-230.
5. Carlson BM, Faulkner JA. Muscle transplantation between young and old rats: Age of host determines recovery. *Am J Physiol*, 1989;256, C1262-C1266.
6. Carter CS, Hofer T, Seo AT, Leeuwenburgh C. Molecular mechanisms of life- and health- span extension: Role of calorie restriction and exercise intervention. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2007;32:954-966.
7. Chung HY, Cesar M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev*, 2009:18-30.
8. Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science*, 2003;302:1575-1577.
9. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*, 2005;433: 60-764.
10. Collins CA, Olsen I, Zammit PS. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*, 2005;122:289-301.
11. Collins CA, Zammit PS, Ruiz AP, Morgan JE, Partridge TA. A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging. *Stem Cells*, 2007;25:885-894.
12. Drummond MJ, McCarthy JJ, Sinha M, Spratt HM. Aging and MicroRNA Expression in Human Skeletal Muscle: A Microarray and Bioinformatics Analysis. *Physiol Genomics*, 2010;43:595-603.
13. Dumke BR, Lees SJ. Age-related impairment of T cell-induced skeletal muscle precursor cell function. *Am J*

- Physiol Cell Physiol, 2011;300:C1226-33.
14. Espada JI, Varela I, Flores AP, Ugalde J, Cadiñanos AM, Pendás CL, Stewart K, Tryggvason L, Blasco MA, Freije JMP López-Otín C. Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *J Cell Biol*, 2008;181:27–35.
  15. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*, 1978; 201:875-880.
  16. Giresi PG, Stevenson EJ, Theilhaber J, Koncarevic A, Parkington J, Fielding RA, Kandarian SC. Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiol Genomics*, 2005;21:253-263.
  17. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res*, 1998;39:1529-1542.
  18. Gopinath SD, Rando TA. Stem cell review series: Aging of the skeletal muscle stem cell niche. *Aging Cell*, 2008;7:590–598.
  19. Grounds MD. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann NY Acad Sci*, 1998;854:78–91.
  20. Hall JK, Banks GB, Chamberlain JS, Olwin BB. Prevention of muscle aging by myofiber-associated satellite cell transplantation. *Sci Transl Med*. 2010;2:57ra83.
  21. Halliwell B, Gutteridge JMC. Mechanisms of damage to cellular targets by oxidative stress: lipid peroxidation. *Free Rad Biol Med*, 1999;284-313.
  22. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 2001; 91:534–551.
  23. Hayflick L. *How and Why We Age*. New York, NY, USA, 1994. Ballantine Books.
  24. Jang YC, Van Remmen H. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol*, 2010; 46:193-198.
  25. Jensen GL. Inflammation: roles in aging and sarcopenia. *J Parenter Enteral Nutr*, 2008;32:656-659.
  26. Jin YN, Johnson GV. The interrelationship between mitochondrial dysfunction and transcriptional dysregulation in Huntington disease. *J Bioenerg Biomembr*, 2010;42:199-205.
  27. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*, 2004;18:357–368.
  28. Kim J, Kwak H, Leeuwenburgh C, Lawler JM. Lifelong Exercise and Mild (8%) Caloric Restriction Attenuate Age-induced Alterations in Plantaris Muscle Morphology, Oxidative Stress and IGF-1 in the Fischer-344 Rat. *Exp Gerontol*, 2008;43:317-329.
  29. Koopman R, Van Loon LJ. Aging, exercise and muscle protein metabolism. *J Appl Physiol*, 2009;106:2040-2048.
  30. Leeuwenburgh C. Role of apoptosis in sarcopenia. *J Gerontol Med Sci*, 2003;58:999-1001.
  31. Leeuwenburgh C, Wagner P, Holloszy JO, Sohal RS, Heinecke JW. Caloric restriction attenuates dityrosine cross-linking of cardiac and skeletal muscle proteins in aging mice. *Arch Biochem Biophys*, 1997;46:74-80.
  32. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*, 2000;106:847-856.
  33. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*, 2006;30:145-151.
  34. Marzetti E, Wohlgemutz SE, Lees HA, Chung H, Giovannini S, Leeuwenburgh C. Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mech Ageing Dev*, 2008;129:542-549.
  35. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*, 1961;9:493–495.
  36. Maximow A. The Lymphocyte as a stem cell common to different blood elements in embryonic development and during the post-fetal life of mammals. *German: Folia Haematologica*, 2009;8:125-134.
  37. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*, 2006;16:R551-60.
  38. McKiernan SH, Colman RJ, Lopez M, Beasley TM. Caloric restriction delays aging-induced cellular phenotypes in rhesus monkey skeletal muscle. *Exp Gerontol*, 2011;46:23-29.
  39. Meng SJ, Yu LJ. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci*, 2010;11:1509-1526.
  40. Moylan JS, Reid MB. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve*, 2007;35: 411-429.
  41. Muir A, Kanji AH, Allbrook D. The structure

- of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat*, 1965;99:435–444.
42. Muller FL, Song W, Jang YC, Liu Y, Sabia M, Richardson A, Van Remmen H. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007;293:R1159-1168.
  43. Nitahara JA, Cheng W, Liu Y, Li B, Leri A, Mogul D, Gambert SR, Kajstura J, Anversa P. Intracellular calcium, DNase activity and myocyte apoptosis in aging Fischer 344 rats. *J Mol Cell Cardiol*, 1998;19:519-535.
  44. Phillips T, Leeuwenburgh C. Muscle fiber specific apoptosis and TNF- $\alpha$  signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *FASEB*, 2005;19:668-670.
  45. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*, 2007;25:2896-2902.
  46. Piette J, Piret B, Bonizzi G, Schoonbroodt S, Merville MP, Legrand-Poels S, Bours V. Multiple redox regulation in NF- $\kappa$ B transcription factor activation. *J Bio Chem*, 1997;378:1237-1245.
  47. Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and muscle wasting: A cellular perspective. *Resp Res*, 2001;2:269-272.
  48. Renault V, Piron-Hamelin G, Forestier C, DiDonna S, Decary S, Hentati F, Saillant G, Butler-Browne GS, Mouly V. Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol*, 2000;35:711–719.
  49. Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids*, 1987;44:175-189.
  50. Roth SM, Martel GF, Ivey FM, Lemmer JT, Metter EJ, Hurley BF, Rogers MA. Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women. *Anat Rec*, 2000;260:351–358.
  51. Safdar A, Hamadeh MJ, Kaczor JJ, Raha S. Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults. *PLoS One*, 2010;5:e10778.
  52. Sahin E, Colla S, Liesa M, Moslehi J. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*, 2011;470:359-365.
  53. Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat Cell Biol*, 2008;doi: 10.1038/ncb1708.
  54. Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2002;1576:1–14.
  55. Shefer G, Van de Mark DP, Richardson JB, Yablonka-Reuveni Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol*, 2006;294: 50–66.
  56. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol*, 1963;62:327–336.
  57. Siu PM, Pistilli EE, Alway SE. Age-dependent increase in oxidative stress in gastrocnemius muscle with unloading. *J. Applied Physiol*, 2008;94:1695-1705.
  58. Tabner BJ, El Agnaf OM, Turnbull S, German MJ, Paleologou KE, Hayashi Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Allsop D. Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *J Biol Chem*, 2005;280:35789-35792.
  59. Thornell LE. Sarcopenic obesity: satellite cells in the aging muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2011;14:22-27.
  60. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006;160: 1–40.
  61. Wagers AJ, Conboy IM. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell*, 2005;122:659–667.
  62. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 1999;98:115–124.

### **Carmen Ríos**

Realizó su licenciatura en Ciencias Biológicas en la Universidad de Maryland College Park y su maestría en Biotecnología en la Universidad de Johns Hopkins; obtuvo su doctorado en Bioquímica y Biología Molecular en la Escuela de Medicina de la Universidad de Miami. Previo a su ingreso en la carrera científica, la Dra. Ríos fue maestra de Biología por diez años.

Actualmente está realizando una estancia posdoctoral en el Instituto Barshop para Estudios de Envejecimiento y Longevidad, Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en San Antonio (UTHSCSA). Antes de asumir este cargo en el Instituto Barshop, trabajó como investigadora en el Centro Médico de Veteranos en Miami. Su trabajo actual se enfoca en la neurodegeneración y sus efectos en la sarcopenia durante el envejecimiento y enfermedades de la tercera edad.

**Jesús Aguirre Hernández**

Veterinary Medicine, University of Cambridge.

ja248@cam.ac.uk

apoptosis y senescencia celular: la primera es un proceso de suicidio celular que se lleva a cabo mediante vías genéticamente determinadas; la segunda es un proceso que detiene la división de la célula de modo permanente. A lo largo de la vida estos procesos actúan como supresores de tumores, ya que impiden la división tanto de células cuyo material genético está dañado como de aquellas que están expuestas a diversas condiciones que podrían provocar ese daño. Sin embargo, la actuación de estos procesos va reduciendo el número de células capaces de regenerar y reparar los tejidos. Por lo tanto, a la larga, a cambio de proteger contra la aparición del cáncer, estos procesos contribuyen al envejecimiento.

Por otro lado, algunas de las alteraciones genéticas, por azar, pueden afectar justamente los genes que participan en la apoptosis y en la senescencia celular y, conforme transcurre la vida del individuo, aumenta la probabilidad de que algunas células acumulen mutaciones suficientes para que dejen de funcionar ambos procesos y esto, a su vez, aumenta la probabilidad de que se presente el cáncer. Es por esto que a largo plazo convergen la vejez y el cáncer. Observaciones en células y tejidos, en humanos y en ratones, y las características de personas con algunos síndromes de envejecimiento prematuro, proporcionan evidencia sobre esta relación entre cáncer y envejecimiento. En suma, el buen funcionamiento de la apoptosis y de la senescencia celular contribuye al envejecimiento; su mal funcionamiento, en cambio, permite la aparición del cáncer.

En especies que cuentan con la capacidad de regenerar y reparar tejidos en el estado adulto, como la nuestra, estas funciones dependen del crecimiento y la división de células somáticas, fundamentalmente de células troncales y progenitoras. Tanto el crecimiento como la división celular están regulados por proteínas que garantizan que las fases del ciclo celular se lleven a cabo de manera ordenada y en la secuencia correcta. No obstante, las células están expuestas a factores internos (errores en la replicación del ADN, acortamiento de los telómeros, generación de moléculas altamente reactivas) y externos (radiación ionizante, luz UV, agentes químicos, infecciones virales)

que pueden provocar alteraciones en el material genético o en el funcionamiento del ciclo celular. Frente a esto, las células cuentan con mecanismos que monitorean la integridad del material genético, que perciben la sobreexpresión de genes que promueven la proliferación celular y que detectan condiciones como la hipoxia y la limitación de nutrientes (Ben-Porath *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

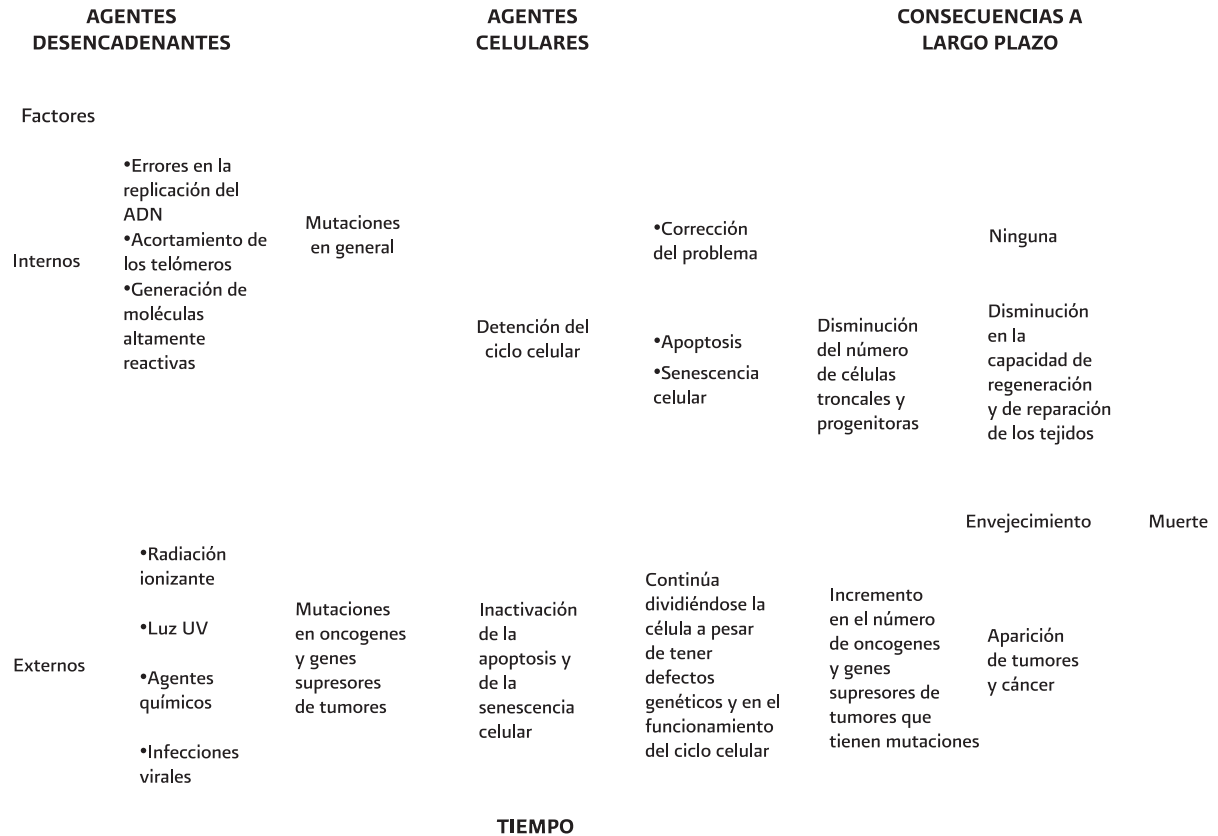
Cuando se presenta alguna de estas condiciones se desencadenan mecanismos que detienen el ciclo celular (figura 1). Después puede ocurrir: 1) que el ciclo celular se reanude si se subsanan las condiciones anormales que lo detuvieron; 2) que la célula se dirija hacia la apoptosis, proceso mediante el cual la célula provoca su propia muerte (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie, 2010); ó 3) que la célula se dirija hacia la senescencia celular, estado en el cual el ciclo celular se detiene permanentemente (Hayflick, 1965). Que se presente alguna de estas tres posibilidades depende del tipo celular, del contexto en el que ocurre la detención del ciclo y de la magnitud del daño en el material genético, si éste existe. En cualquier caso, las tres respuestas impiden que se transmita el daño a las células hijas y que éste se agrave en divisiones subsecuentes por acumulación de más mutaciones, o por inestabilidad genómica, lo que podría conducir al cáncer.

La apoptosis y la senescencia celular son, por lo tanto, mecanismos que impiden la formación de tumores. Sin embargo, todas las células, incluyendo las troncales, están expuestas constantemente a la aparición de mutaciones y de daño en el material genético y, consecuentemente, a la posibilidad de desembocar en la apoptosis o en la senescencia celular. Esto implica que conforme transcurre la vida del individuo aumenta el número de células troncales en senescencia celular o que mueren por apoptosis. Esto disminuye la capacidad de mantenimiento y reparación de los tejidos y, de este modo, senescencia y apoptosis contribuyen al envejecimiento. De acuerdo con lo expuesto, apoptosis y senescencia celular actúan como mecanismos supresores de tumores pero, a cambio, contribuyen al envejecimiento (Campisi, 2003; 2005; Collado *et al.*, 2007).

### **Apoptosis y senescencia celular como mecanismos supresores de tumores**

Hay abundante evidencia, *in vitro* e *in vivo*, sobre el papel





**TIEMPO**

Figura 1. Relación entre las mutaciones, los mecanismos que previenen la aparición del cáncer y el envejecimiento.

de estos procesos en la supresión de tumores; por ejemplo, el exceso de señales de proliferación (por alteraciones en MYC, RAS, RAF, E2F y ciclina E; o debido a la oncoproteína viral E1A) provoca la senescencia mediada por p53, p16<sup>INK4A</sup> y p14<sup>ARF</sup> (llamada p19<sup>Arf</sup> en el ratón) (Serrano *et al.*, 1997; Lowe, 1999; Lin *et al.*, 2001; Lazzerini Denchi *et al.*, 2005; Michaloglou *et al.*, 2005). MYC induce la síntesis de p14<sup>ARF</sup> (figura 2); RAS induce la formación de p14<sup>ARF</sup> y de p16<sup>INK4A</sup>. A su vez, p14<sup>ARF</sup> secuestra MDM2, lo que permite que p53 active la transcripción de genes que detienen el ciclo celular en G1/S (Lanigan *et al.*, 2011). Por su parte, p16<sup>INK4A</sup> impide la fosforilación de pRB1, que también evita el avance del ciclo celular. Adicionalmente, las señales de proliferación anormales también conducen a la senescencia porque provocan errores en la replicación del material genético y rupturas en el ADN que activan los mecanismos de respuesta al daño en el ADN (Bartkova *et al.*, 2006; Di Micco *et al.*, 2006). Por otro lado, en tumores premalignos, en humanos y

en ratones, hay abundantes células senescentes, pero no en tumores malignos (Collado *et al.*, 2010), lo que confirma la necesidad de que se inactiven los mecanismos de la senescencia para que aparezcan estos últimos.

En el corazón de la apoptosis y de la senescencia se encuentran las proteínas p53, pRB1, p16<sup>INK4A</sup> y p14<sup>ARF</sup>, por lo que no sorprende que con frecuencia estén mutadas en tumores malignos. p53 exhibe mutaciones en más de 50% de los tumores humanos (Olivier *et al.*, 2010) y los que no las presentan las tienen en otros genes de la misma vía (por ejemplo, MDM2); en el caso de tumores provocados por virus de ADN, la inactivación de p53 (y de pRB1) corre por cuenta de oncoproteínas virales (Felsani *et al.*, 2006; Levine, 2009). En cuanto al locus CDKN2A-CDKN2B-CDKN2B-AS1, formado por tres genes supresores de tumores, frecuentemente se pierde por delección (Sharpless, 2005) o es inactivado por metilación (Merlo *et al.*, 1995). CDKN2A, por sí solo, codifica dos

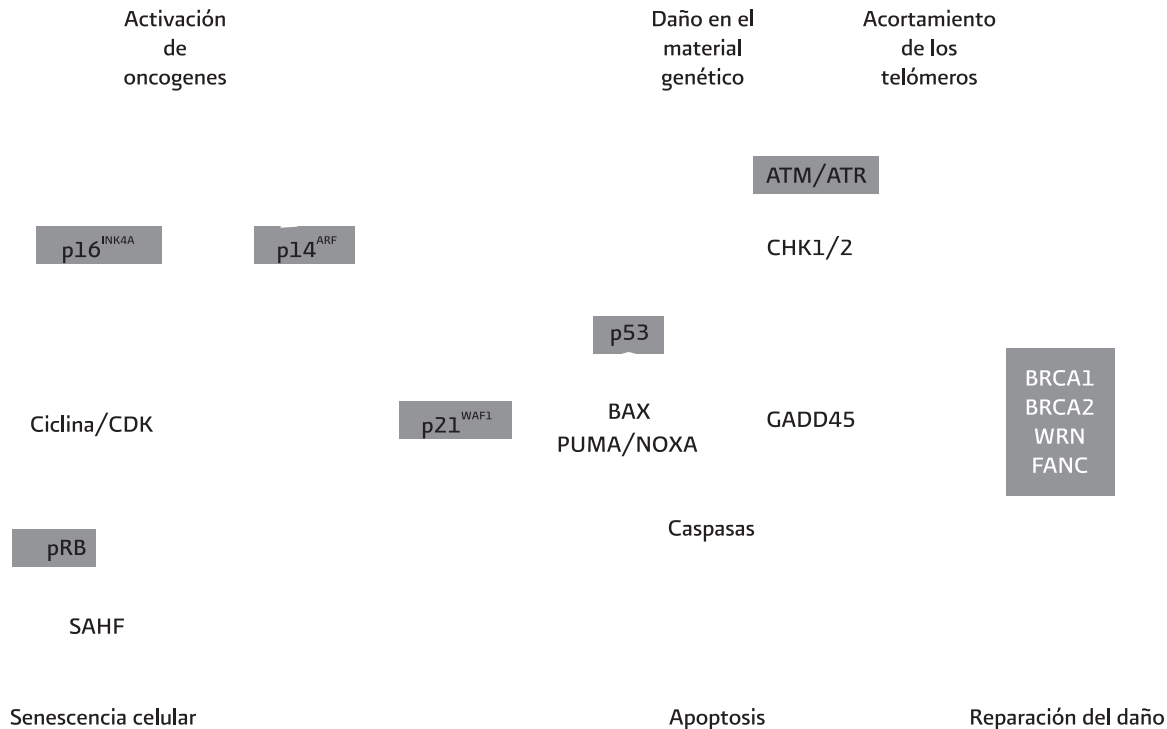


Figura 2. Algunas de las principales moléculas que participan en las vías de la reparación del daño celular, la apoptosis y la senescencia celular. Muchas de ellas son oncoproteínas (fondo naranja) o proteínas que participan en la supresión de tumores (fondo gris) y sus genes presentan mutaciones en las células tumorales. Cuando no puede repararse el daño en el material genético, las células desembocan en la apoptosis o en la senescencia celular. A medida que se incrementa el número de células en estos dos últimos estados, disminuye la capacidad de regeneración de los tejidos, y esto se asocia con la vejez.

proteínas con funciones distintas, p16<sup>INK4A</sup> y p14<sup>ARF</sup>; éstas se pierden cuando el gen está alterado, privando a la célula de dos proteínas e interfiriendo simultáneamente con el funcionamiento de p53 y de pRB1 en la senescencia celular, y de p53 en la apoptosis (Zuckerman *et al.*, 2009). *CDKN2B* y *CDKN2B-AS1* también participan en la regulación del ciclo celular (Camacho *et al.*, 2010; Kotake *et al.*, 2010) y el segundo ha sido asociado con diversas enfermedades y podría tener un papel en el envejecimiento (Pasmant *et al.*, 2011). Muchos otros genes que participan en la apoptosis y en la senescencia presentan mutaciones en diversos tumores; por ejemplo, *BRCA1* en cáncer de mama y de ovario, *BCL2* en linfomas, y caspasas en diversos tumores (Chavami *et al.*, 2009).

Finalmente, la división celular y algunos factores ambientales adversos provocan el acortamiento de los telómeros que, al cruzar un umbral, desencadenan la respuesta contra el daño en el ADN y sobreviene la senescencia celular (Epel *et al.*, 2004; Blasco, 2005).

Esto impide que las células se dividan indefinidamente y representa una barrera para el desarrollo del cáncer: en ratones se requiere la reactivación de la telomerasa para evitar que las células tumorales entren en senescencia por el acortamiento de los telómeros (Feldser *et al.*, 2007) y en más de 90% de los tumores humanos la telomerasa se halla reactivada (Kim *et al.*, 1994; Shay *et al.*, 1997).

### Apoptosis, senescencia celular y envejecimiento

También hay evidencia acerca del papel de estos mecanismos en el envejecimiento (Jeyapalan *et al.*, 2008). Por ejemplo, en primates y en ratones, las células senescentes aumentan con la edad y se acumulan en tejidos con envejecimiento normal (Jeyapalan *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009); con la edad, tanto en ratones como en humanos la senescencia y la apoptosis están asociadas con la disminución de células troncales o progenitoras, y esta disminución está acompañada de una reducción en la capacidad de regeneración de los tejidos (Flores *et al.*, 2005; Krishnamurthy *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008).

Se ha considerado a p16<sup>INK4A</sup> un marcador de envejecimiento (Krishnamurthy *et al.*, 2004). Su gen, *CDKN2A*, se activa a medida que envejece el individuo, por lo que el nivel de p16<sup>INK4A</sup> y p14<sup>ARF</sup> aumenta con la edad (Ressler *et al.*, 2006). En ratones, la disminución en el número de células troncales está asociada con un aumento en el nivel de p16<sup>INK4a</sup> (Zindy *et al.*, 1997), mientras que la ausencia de esta proteína, en ratones genéticamente modificados, incrementa la capacidad de regeneración tisular y el riesgo de presentar tumores. En células en cultivo, el nivel de p16<sup>INK4A</sup> también aumenta con el pasaje celular (Alcorta *et al.*, 1996).

Por su parte, los telómeros exhiben una asociación entre su longitud y la mortalidad en personas con más de 60 años (Cawthon *et al.*, 2003). En ratones, los telómeros más largos se hallan en células troncales y se acortan con la edad, y estas células no se dividen cuando los telómeros son muy cortos (Flores *et al.*, 2008). Finalmente, las células humanas en cultivo, modificadas para expresar la telomerasa, no muestran acortamiento de los telómeros ni senescencia (Bodnar *et al.*, 1998).

### Experimentos con ratones modificados genéticamente

En ratones, los experimentos con *Tp53*, *Cdkn2a-Cdkn2b* y telomerasa han mostrado que la apoptosis y la senescencia previenen el desarrollo del cáncer y, por razones sólo parcialmente comprendidas, dependiendo del gen que se modifique, puede o no haber cambios en el envejecimiento y en la longevidad. Los ratones que expresan constitutivamente una variante corta de p53 tienen un menor riesgo de desarrollar tumores, muestran disminución de células troncales, envejecen prematuramente y presentan una mayor proporción de células senescentes que los ratones normales (Tyner *et al.*, 2002; Maier *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2007). Cuando son expuestos a radiación ionizante se observa apoptosis, en lugar de la senescencia celular observada en los ratones normales (Hinkal *et al.*, 2009).

En otros experimentos se agregó una copia adicional del *locus* *Tp53*, regulado normalmente al incluir la región promotora (García-Cao *et al.*, 2002), o se crearon ratones hipomórficos *Mdm2* (Mendrysa *et al.*, 2006); en ambos, el nivel basal de p53 es moderadamente más elevado que en los ratones normales y el riesgo de presentar tumores

es menor pero, a diferencia de los primeros ratones, no se altera la longevidad ni hay envejecimiento prematuro, aun si carecen de telomerasa (García-Cao *et al.*, 2002; García-Cao *et al.*, 2006). Con dos copias adicionales de *Tp53* tampoco aumenta la longevidad (Matheu *et al.*, 2009). Las diferencias en estos resultados se atribuyen a que en el primero hay una variante truncada de *Tp53*, que además se expresa constitutivamente, mientras que en el segundo hay un *locus* completo y está sujeto a regulación normal (Courtois *et al.*, 2004; Murray-Zmijewski *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2007; Bourougaa *et al.*, 2010).

En ratones con una o dos copias adicionales del *locus* *Cdkn2a-Cdkn2b* (que codifican p16<sup>INK4a</sup>, p19<sup>ARF</sup> y p15<sup>INK4b</sup>) aumenta la resistencia al cáncer y, en los machos, se reduce la fertilidad; estos efectos son proporcionales al número de copias extra del *locus* (Matheu *et al.*, 2008; Matheu *et al.*, 2009). Dos copias adicionales (pero no una sola) incrementan la mediana de la longevidad y retrasan el envejecimiento (Matheu *et al.*, 2004; Matheu *et al.*, 2008). Ratones con una copia adicional de *Tp53* y de *Cdkn2a-Cdkn2b* también muestran un menor riesgo de desarrollar cáncer y un incremento en la mediana de la longevidad (Matheu *et al.*, 2007). A partir de estos y otros experimentos se ha sugerido que quizá p16<sup>INK4a</sup> contribuye al envejecimiento, mientras que p19<sup>ARF</sup> contribuiría a evitarlo (Collado *et al.*, 2007; Baker *et al.*, 2008a; Baker *et al.*, 2008b; Matheu *et al.*, 2009), pero se requiere investigar más al respecto. Los experimentos anteriores también sugieren que, además de *Tp53* y *Cdkn2a-Cdkn2b*, hay otros factores genéticos, todavía no identificados, que determinan la senescencia y la longevidad.

Para los experimentos siguientes es necesario recordar que los ratones, a diferencia del humano, sí expresan la telomerasa en múltiples tejidos (Seluanov *et al.*, 2008). En los ratones carentes de telomerasa y de p53 se observa acortamiento de los telómeros, inestabilidad cromosómica (derivada de la fusión y ruptura de los cromosomas) y desarrollo de tumores (Artandi *et al.*, 2000). Los ratones modificados, que expresan la telomerasa en células en las que normalmente no está activa, muestran un mayor riesgo de presentar tumores (Gonzalez-Suarez *et al.*, 2001; Artandi *et al.*, 2002), pero también muestran una disminución en la incidencia de enfermedades degenerativas y los que no presentan

cáncer tienen una mayor longevidad (Gonzalez-Suarez *et al.*, 2005). Si la telomerasa se expresa constitutivamente, y además hay niveles más elevados de p53, p16<sup>Ink4a</sup> y p19<sup>Af</sup>, la longevidad media de los ratones aumenta y se retrasa el envejecimiento, pero sin que aumente el riesgo de presentar tumores (por la copia extra de *Tp53* y de *Cdkn2a-Cdkn2b*) (Tomas-Loba *et al.*, 2008). En ratones carentes de telomerasa y de p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, que detiene el ciclo celular, la longevidad es mayor que en aquellos carentes de telomerasa pero que tienen p21<sup>Cip1/Waf1</sup> (Ungewitter *et al.*, 2009); en esos ratones la ausencia de p21<sup>Cip1/Waf1</sup> provoca que se reactive la proliferación de células troncales y progenitoras sin que haya un aumento en el riesgo de cáncer.

También se han estudiado ratones con alteraciones en genes que participan en la detección y en la reparación del daño en el ADN (Lombard *et al.*, 2005), y sus características difieren si el gen participa en la detección del daño o en su reparación (Collado *et al.*, 2007). En el primer caso se acumula el daño y se incrementa el riesgo de presentar cáncer, sin que haya envejecimiento prematuro, ya que no se desencadenan apoptosis ni senescencia. En cambio, cuando son los mecanismos de reparación del daño los que están alterados, el daño sí lleva al envejecimiento prematuro. Los padecimientos humanos, debidos a mutaciones en genes que participan en la detección y en la reparación del daño en el material genético, también difieren en sus características dependiendo de la función del gen (Blasco, 2005). Por ejemplo, en el Síndrome de Werner (OMIM 277700) y en la disqueratosis congénita (OMIM 305000) hay envejecimiento prematuro y una mayor predisposición al cáncer (Burtner *et al.*, 2010).

### El cáncer en la vejez

A lo largo de la vida, la apoptosis y la senescencia celular protegen contra el desarrollo del cáncer, a cambio de contribuir al envejecimiento. Y, sin embargo, el cáncer se asocia con la vejez. Esto se debe a la actuación de causas próximas y de causas últimas (Mayr, 1982). Las causas próximas son las mutaciones, el daño en el ADN y algunas infecciones virales. Estos factores no conducen al cáncer si la apoptosis y la senescencia funcionan adecuadamente. Sin embargo, por azar, esos factores pueden afectar genes involucrados en estos mecanismos, por lo que las células afectadas continuarán dividiéndose a pesar de las anomalías en el material genético y en su funcionamiento.

Como la aparición del cáncer requiere múltiples mutaciones en diversas vías celulares (Hanahan *et al.*, 2000; Yeung *et al.*, 2008), y las mutaciones ocurren al azar, la acumulación, en una misma célula, de las mutaciones necesarias para el cáncer, es un proceso que lleva tiempo aun en presencia de inestabilidad genómica (Gasparini *et al.*, 2007; Venkitaraman, 2007; Negrini *et al.*, 2010; Stephens *et al.*, 2011). Esto explicaría la asociación entre cáncer y vejez, aunque es probable que haya causas adicionales como, por ejemplo, la inmunosenescencia (causada por la misma senescencia celular) (Swann *et al.*, 2007; Fulop *et al.*, 2010) y la secreción, por parte de células senescentes, de factores de crecimiento, citocinas y metaloproteinasas capaces de promover la proliferación de células vecinas, la angiogénesis, la invasión de tejidos y la migración; características éstas de las células malignas (Coppe *et al.*, 2010). En cuanto a las causas últimas, la asociación entre el cáncer y la vejez, y quizá la persistencia misma de éstos, explicaría por qué no afectan la aptitud reproductiva, en tanto que se presentan en la etapa postreproductiva del individuo (Leroi *et al.*, 2003; Ljubuncic *et al.*, 2009).

Se ha expuesto con cierto detalle la relación entre el cáncer y el envejecimiento, mediada por la apoptosis y la senescencia celular. Sin embargo, esto no agota los aspectos del funcionamiento celular que son relevantes tanto para el cáncer como para el envejecimiento y la longevidad. Otros aspectos importantes son: el papel de p53 en la regulación del metabolismo celular (Feng *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2010), el papel de las proteínas de choque térmico (Calderwood *et al.*, 2006; Tower, 2009) y el funcionamiento de las mitocondrias (Wallace, 2005; Ladiges *et al.*, 2010).

1. Alcorta DA, Xiong Y, et al. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996;93:13742-13747.
2. Artandi SE, Alson S, et al. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99:8191-8196.
3. Artandi SE, Chang S, et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*, 2000;406:641-645.

4. Baker DJ, Jin F, et al. The yin and yang of the Cdkn2a locus in senescence and aging. *Cell Cycle*, 2008a;7:2795-2802.
5. Baker DJ, Perez-Terzic C, et al. Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat Cell Biol*, 2008b;10:825-836.
6. Bartkova J, Rezaei N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 2006;444:633-637.
7. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005;37:961-976.
8. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, 2005;6:611-622.
9. Bodnar AG, Ouellette M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 1998;279:349-352.
10. Bourougaa K, Naski N, et al. Endoplasmic reticulum stress induces G2 cell-cycle arrest via mRNA translation of the p53 isoform p53/47. *Mol Cell*, 2010;38:78-88.
11. Burtner CR, Kennedy BK. Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010;11:567-578.
12. Calderwood SK, Khaleque MA, et al. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*, 2006;31:164-172.
13. Camacho CV, Mukherjee B, et al. Loss of p15/Ink4b accompanies tumorigenesis triggered by complex DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 2010;31:1889-1896.
14. Campisi J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol*, 2003;38:5-11.
15. Campisi J. Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act! *Mech Ageing Dev*, 2005;126:51-58.
16. Cawthon RM, Smith KR, et al. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*, 2003;361:393-395.
17. Collado M, Blasco MA, et al. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 2007;130:223-233.
18. Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*, 2010;10:51-57.
19. Coppe JP, Desprez PY, et al. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 2010;5:99-118.
20. Courtois S, de Fromental CC, et al. p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms. *Oncogene*, 2004;23:631-638.
21. Di Micco R, Fumagalli M, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 2006;444:638-642.
22. Epel ES, Blackburn EH, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004;101:17312-17315.
23. Feldser DM, Greider CW. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell*, 2007;11:461-469.
24. Felsani A, Mileo AM, et al. Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene*, 2006;25:5277-5285.
25. Feng Z, Levine AJ. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends Cell Biol*, 2010;20:427-434.
26. Flores I, Canela A, et al. The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev*, 2008;22:654-667.
27. Flores I, Cayuela ML, et al. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science*, 2005;309:1253-1256.
28. Fulop T, Kotb R, et al. Potential role of immunosenescence in cancer development. *Ann N Y Acad Sci*, 2010;1197:158-165.
29. Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, et al. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J*, 2002;21:6225-6235.
30. Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, et al. Increased p53 activity does not accelerate telomere-driven ageing. *EMBO Rep*, 2006;7:546-552.
31. Gasparini P, Sozzi G, et al. The role of chromosomal alterations in human cancer development. *J Cell Biochem*, 2007;102:320-331.
32. Ghavami S, Hashemi M, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet*, 2009;46:497-510.
33. Gonzalez-Suarez E, Geserick C, et al. Antagonistic

- effects of telomerase on cancer and aging in K5-mTert transgenic mice. *Oncogene*, 2005;24:2256-2270.
34. Gonzalez-Suarez E, Samper E, et al. Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *EMBO J*, 2001;20:2619-2630.
  35. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000;100:57-70.
  36. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, 1965;37:614-636.
  37. Hinkal GW, Gatz CE, et al. Altered senescence, apoptosis, and DNA damage response in a mutant p53 model of accelerated aging. *Mech Ageing Dev*, 2009;130:262-271.
  38. Jayapalan JC, Ferreira M, et al. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev*, 2007;128:36-44.
  39. Jayapalan JC, Sedivy JM. Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev*, 2008;129:467-474.
  40. Kerr JF, Wyllie AH, et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972;26:239-257.
  41. Kim NW, Piatyszek MA, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994;266:2011-2015.
  42. Kotake Y, Nakagawa T, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene*, 2010;29:December 2010; doi: 2010.1038/onc.2010.2568.
  43. Krishnamurthy J, Ramsey MR, et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*, 2006;443:453-457.
  44. Krishnamurthy J, Torrice C, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*, 2004;114:1299-1307.
  45. Ladiges W, Wanagat J, et al. A mitochondrial view of aging, reactive oxygen species and metastatic cancer. *Aging Cell*, 2010;9:462-465.
  46. Lanigan F, Geraghty JC, et al. Transcriptional regulation of cellular senescence. *Oncogene*, 2011;30:March 2011; doi: 2010.1038/onc.2011.2034.
  47. Lazzerini Denchi E, Attwooll C, et al. Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland. *Mol Cell Biol*, 2005;25:2660-2672.
  48. Leroi AM, Koufopanou V, et al. Cancer selection. *Nat Rev Cancer*, 2003;3:226-231.
  49. Levine AJ. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology*, 2009;384:285-293.
  50. Li J, Lee B, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem*, 2006;281:7260-7270.
  51. Lin AW, Lowe SW. Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001;98:5025-5030.
  52. Ljubuncic P, Reznick AZ. The evolutionary theories of aging revisited--a mini-review. *Gerontology*, 2009;55:205-216.
  53. Lombard DB, Chua KF, et al. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*, 2005;120:497-512.
  54. Lowe SW. Activation of p53 by oncogenes. *Endocr Relat Cancer*, 1999;6:45-48.
  55. Maier B, Gluba W, et al. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev*, 2004;18:306-319.
  56. Matheu A, Maraver A, et al. Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell*, 2009;8:152-161.
  57. Matheu A, Maraver A, et al. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature*, 2007;448:375-379.
  58. Matheu A, Maraver A, et al. The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer Res*, 2008;68:6031-6034.
  59. Matheu A, Pantoja C, et al. Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev*, 2004;18:2736-2746.
  60. Mayr E. *The growth of biological thought : diversity, evolution, and inheritance.* Cambridge, Mass.: Belknap Press, 1982:ix, 974.
  61. Mendrysa SM, O'Leary KA, et al. Tumor suppression and normal aging in mice with constitutively high p53 activity. *Genes Dev*, 2006;20:16-21.
  62. Merlo A, Herman JC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med*, 1995;1:686-692.

63. Michaloglou C, Vredeveld LC, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 2005;436:720-724.
64. Moore L, Lu X, et al. Aging-associated truncated form of p53 interacts with wild-type p53 and alters p53 stability, localization, and activity. *Mech Ageing Dev*, 2007;128:717-730.
65. Murray-Zmijewski F, Lane DP, et al. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ*, 2006;13:962-972.
66. Negrini S, Gorgoulis VG, et al. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010;11:220-228.
67. Olivier M, Hollstein M, et al. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010;2:a001008.
68. Pasmant E, Sabbagh A, et al. ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J*, 2011;25:444-448.
69. Ressler S, Bartkova J, et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell*, 2006;5:379-389.
70. Seluanov A, Hine C, et al. Distinct tumor suppressor mechanisms evolve in rodent species that differ in size and lifespan. *Aging Cell*, 2008;7:813-823.
71. Serrano M, Lin AW, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 1997;88:593-602.
72. Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res*, 2005;576:22-38.
73. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 1997;33:787-791.
74. Stephens PJ, Greenman CD, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, 2011;144:27-40.
75. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*, 2007;117:1137-1146.
76. Tomas-Loba A, Flores I, et al. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*, 2008;135:609-622.
77. Tower J. Hsps and aging. *Trends Endocrinol Metab*, 2009;20:216-222.
78. Tyner SD, Venkatachalam S, et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, 2002;415:45-53.
79. Ungewitter E, Scoble H. Antagonistic pleiotropy and p53. *Mech Ageing Dev*, 2009;130:10-17.
80. Venkitaraman AR. Chromosomal instability in cancer: causality and interdependence. *Cell Cycle*, 2007;6:2341-2343.
81. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 2005;39:359-407.
82. Wang C, Jurk D, et al. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell*, 2009;8:311-323.
83. Wyllie AH. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol*, 2010;42:4-9.
84. Yeung SJ, Pan J, et al. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci*, 2008;65:3981-3999.
85. Yi J, Luo J. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochim Biophys Acta*, 2010;1804:1684-1689.
86. Zhou S, Greenberger JS, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, 2008;7:335-343.
87. Zindy F, Quelle DE, et al. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*, 1997;15:203-211.
88. Zuckerman V, Wolynec K, et al. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol*, 2009;219:3-15.

### Jesús Aguirre Hernández

Egresado de la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Maestría en Biotecnología en el Instituto de Biotecnología de la misma universidad. Doctorado en la Universidad de Cambridge, Inglaterra. Jefe del Departamento de Genética del Hospital Infantil de México (2003-2004). Investigador asociado en la Universidad de Cambridge a partir de 2004. Intereses: estudio de las causas genéticas de enfermedades complejas y monogénicas; principalmente mapeo de genes que predisponen al desarrollo del cáncer y mapeo de mutaciones causantes de enfermedades de la vista,

utilizando al perro como sistema modelo; mapeo de *loci* mediante análisis de asociación con SNPs cubriendo todo el genoma (GWAS); estudios de ligamiento con SNPs y microsatélites; estudios de asociación con *loci* candidatos.



**Layla Michán**

**Claudia Itzel Pedraza**

**Israel Muñoz Velasco**

Departamento de Biología Comparada,  
Laboratorio de Cienciometría, Información e  
Informática en Ciencias Biológicas, Facultad de  
Ciencias, UNAM.

laylamichan@ciencias.unam.mx

ctualmente, la información científica está disponible en cantidades colosales y en formatos diversos. La información biomédica sobre envejecimiento no ha sido la excepción, como evidencia, el número de estudios y los datos experimentales publicados han aumentado de manera exponencial; esta transformación de la práctica científica es un reflejo de la (r)evolución informática: se ha reducido la energía, el costo y el tiempo requeridos para las consultas, el manejo y el análisis de la información digital. Las nuevas técnicas de acceso para explotar las colecciones digitales disponibles han aumentado la eficacia y la exactitud de la recuperación de información, lo que ha fomentado a su vez la colaboración e interdisciplinariedad de la práctica científica.

El desafío de manejar una gran cantidad de datos digitales ha promovido el diseño de herramientas electrónicas más eficientes para la búsqueda, recuperación, manejo y meta-análisis de literatura biomédica digital novedosa y de vanguardia, acorde con las necesidades de nuestra época. En este capítulo se presenta un panorama general de las aplicaciones informáticas más relevantes para el manejo de literatura especializada en envejecimiento desde una perspectiva molecular, en el orden siguiente: 1) información sobre envejecimiento, que incluye tipos de literatura y su flujo; 2) informática para el envejecimiento que comprende aplicaciones web, colecciones bibliográficas y e-ciencia. Todas estas herramientas permiten optimizar la recuperación de literatura y/o favorecen la generación de nuevo conocimiento sobre envejecimiento.

El desarrollo notable de la informática y el cómputo a partir de 1950 ha repercutido mundialmente en la transformación de la comunicación, las relaciones sociales, económicas, políticas y culturales. El uso de las computadoras y el Internet son representativos de esta era digital; ambos permiten la rápida recolección de información, facilitan sistematizar, cotejar, almacenar, analizar y difundir datos, promoviendo la creación de nuevo conocimiento y la difusión del mismo de manera más rápida, eficiente y masiva (Roberts, 2000).

En la práctica científica, esta (r)evolución informática está

caracterizada por el uso de las computadoras, la adopción del formato digital, la democratización, personalización, automatización, actualización e inmediatez (Lindberg, 2003). Dicha transformación influye y es influida por el progreso científico y tecnológico que se suscitó vertiginosamente en el siglo XX. En los albores del siglo XXI, referirse a información científica implica la mención y el uso de términos, métodos, teorías novedosas e innovadoras como: sociedad del conocimiento, sociedad de la información, globalización, acceso a la información, e-ciencia, e-investigación, redes, *grids*, laboratorios, conocimiento basado en la literatura, minería de textos (*text mining*), web semántica, ontologías, índice de impacto, cocitación, Web 2.0 y Web 3.0, redes sociales, plagio, acceso libre, derecho al olvido, retractación, cómputo en la nube (*cloud computing*), por mencionar las más frecuentes (Budd, 1998; Cohen y Hersh, 2005; Robu *et al.*, 2006; Giustini, 2007; Hendler, 2009 Rosenthal *et al.*, 2010).

En la actualidad, muchos de los descubrimientos se hacen *in silico*, procesando en computadoras información digital con base en modelos reales, en contraposición a los experimentos *in vivo* e *in vitro* usuales en el siglo XX. Esta nueva tecnología faculta una reinención de la ciencia, ya que tiene la capacidad de abordar el desafío que implica manejar conjuntos de datos grandes y complejos. Aunque la práctica científica en su conjunto se ha visto afectada por este fenómeno, las ciencias biomédicas han adoptado estas herramientas rápidamente y el volumen de nuevos conocimientos obtenidos ha crecido significativamente; por ejemplo, la producción de artículos en esta área del conocimiento tiene un crecimiento exponencial (Cohen y Hersh, 2005). Otro ejemplo lo constituyen los métodos y herramientas electrónicas novedosas y de vanguardia para búsqueda, recuperación, manejo y meta-análisis de información biomédica digital acorde a las necesidades y retos de nuestro tiempo, lo que se ha traducido incluso en el surgimiento de nuevos campos del conocimiento como producto de la sinergia entre el cómputo y subdisciplinas biológicas, como la bioinformática, la neuroinformática, la informática médica, informática de la salud, inmunoinformática, por mencionar algunas (Lindberg, 2003; Demagalhaes y Toussaint, 2004).

La repercusión del impacto de la informática en la investigación sobre envejecimiento no es la excepción;

de hecho, existen varios ejemplos representativos que expondremos a continuación: 1) información sobre envejecimiento, que incluye tipos de literatura y su flujo; 2) informática para el envejecimiento que comprende aplicaciones web, colecciones bibliográficas y e-ciencia.

**La información sobre envejecimiento**

La información científica es un recurso básico para el conocimiento humano que representa un conjunto de temas diversos; actualmente la información biomédica puede estar disponible en formato impreso o electrónico; consiste en textos (pueden ser artículos, libros, etc.), imágenes y sonido; se encuentra sistematizada en bases de datos, catálogos o listas; su consulta puede ser libre o restringida; trata sobre los seres vivos o sus partes, fenómenos y explicaciones, versa sobre publicaciones, investigadores, proyectos, grupos y líneas de investigación, convenios, subsidios, producción científica, instituciones de enseñanza y sociedades científicas, por mencionar

algunas (Meadow, 1997; Buckland, 1999; Nentwich, 2003; Ashraf, 2004).

De todos los tipos de información biomédica sobre envejecimiento, en este documento únicamente abordaremos la literatura especializada, que consiste en artículos, memorias, capítulos y libros. Como toda información, la biomédica tiene un flujo cíclico con un carácter dinámico; en la figura 1 se presentan ejemplos del procedimiento de publicación y los tipos de literatura para un tema de envejecimiento. Cabe recalcar la evolución de las publicaciones electrónicas (artículos y revistas digitales e interactivas) entre científicos (Lambiotte y Panzarasa, 2009), que han dado lugar a revistas digitales de vanguardia (*Neurobiology of Aging*, *Aging*, *Mental Health* y *Journal of Aging Studies*), artículos interactivos y fenómenos como la retractación, las revistas que publican resultados negativos y las aplicaciones para detectar plagio de literatura (Budd, 1998; Atlas, 2004).

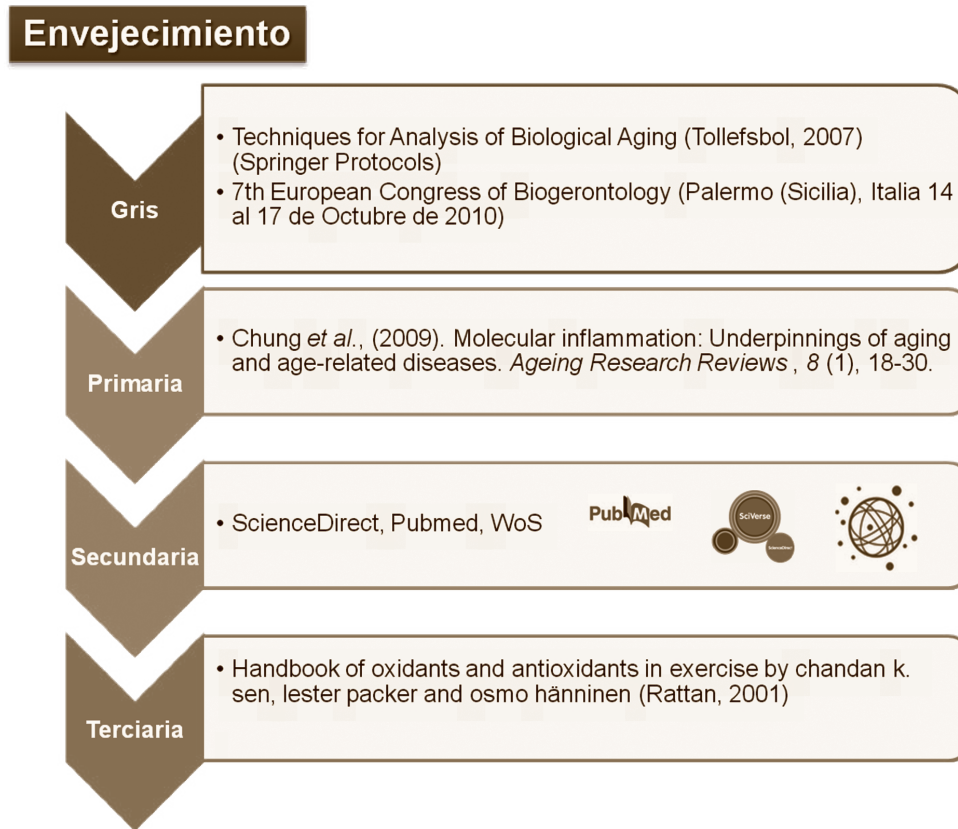


Figura 1. El flujo de la literatura científica sobre envejecimiento: cuadernos de notas y congresos (literatura gris), artículos (literatura primaria), índices y catálogos de referencias (literatura secundaria), y libros y manuales (literatura terciaria).

### Informática

Es común realizar la gestión e integración de la bibliografía biomédica con herramientas informáticas, las cuales son un valioso recurso para el manejo de los datos: adquisición, almacenamiento, procesamiento, recuperación, análisis y difusión (Sinard, 2006; PNBM, 2002). Su uso requiere del entendimiento y asimilación de un conjunto de elementos, como el manejo de computadoras y la destreza para resolver problemas informacionales (Lindberg, 2003; Sinard, 2006), instrumentación de Internet, colaboración mundial y diseño de sistemas de información (Sinard, 2006). En esta categoría agruparemos a aplicaciones web, colecciones bibliográficas y e-ciencia.

### Aplicaciones web

El desarrollo de las aplicaciones web es un componente vital de la infraestructura de la información global (Elbaum, 2005); son creadas por la tecnología disponible en la web y, además, cumplen con una o más de las siguientes condiciones: utilizan una base de datos, se desarrollan mediante un programa desarrollador de aplicaciones, extraen datos de varios registros y archivos, requieren de un servidor en constante ejecución y procesamiento, y generalmente es necesario inscribirse al servicio creando un usuario y una contraseña para tener un espacio asignado en el servidor en el que se guarda la información procesada.

También es común el uso de algoritmos que permiten el análisis u ordenamiento de la información. Varias de estas aplicaciones son producidas por empresas, algunas otras han sido diseñadas por los propios académicos; la mayoría de las que presentamos aquí son amigables y gratuitas. Entre sus funciones están: salvar, etiquetar (*tagging*), almacenar y manejar referencias recuperadas (Michán y Morales, 2009) (figura 2). El conjunto de estas funciones representa un aporte importante a la construcción del nuevo conocimiento científico (Cohen y Widdows, 2009).

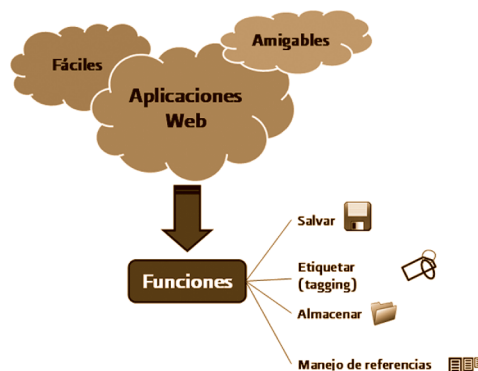


Figura 2. Funciones más comunes de las aplicaciones web para el manejo de la información científica.

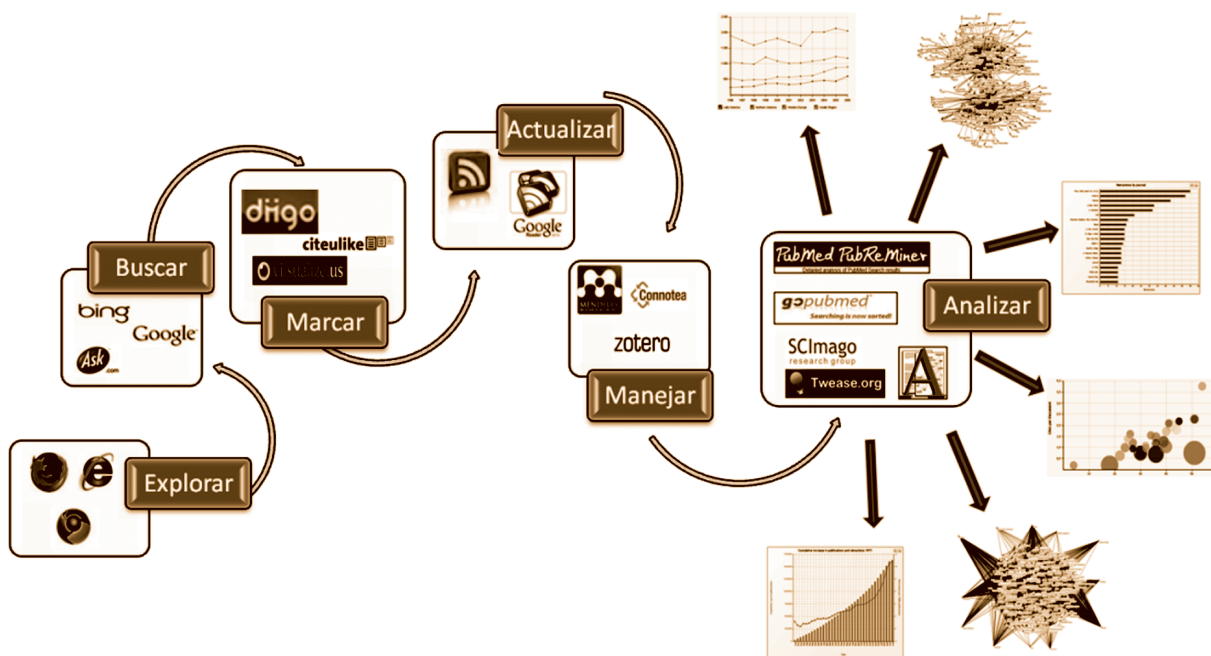


Figura 3. Procesos y aplicaciones correspondientes para la obtención de literatura en la web.

El proceso de la obtención de literatura digital en la web es simultáneo al uso de aplicaciones diseñadas para uno o varios propósitos específicos; hemos dividido este proceso y hemos clasificado a las aplicaciones correspondientes a cada etapa en seis categorías: 1) explorar (exploradores y complementos); 2) buscar (buscadores, metabuscadores y colecciones); 3) marcar (marcadores); 4) actualizar (RSS); 5) manejar (manejadores de bibliografía); y 6) analizar (aplicaciones de meta-análisis automático) (Figura 3, página anterior).

De todas las anteriores, las herramientas más novedosas y sofisticadas son las que permiten el análisis cuantitativo, automático y en tiempo real de miles de registros bibliográficos simultáneamente; con base en ciertas reglas y utilizando medidas específicas (Walker *et al.*, 2008), estos procesos permiten obtener desde frecuencias, tendencias y relaciones hasta mapas completos de las distintas entidades y variables contenidas en los documentos registrados y analizados. Estas aplicaciones cumplen principalmente con dos objetivos: 1) refinar las búsquedas; y 2) visualizar proporciones, tendencias y relaciones de la literatura seleccionada. Varias de ellas tienen funciones únicas que ayudan al investigador a resolver problemas específicos; entre las más frecuentes están: seleccionar y clasificar documentos, extraer

información relevante, facilitar la recuperación, generar resúmenes y elaborar complejos procesos de análisis (pueden ser miles de documentos) de manera simultánea mediante algoritmos complejos que procesan información por uno o varios métodos: bibliometría, análisis de redes, minería de textos y semántica (Michán *et al.*, 2010; Michán *et al.*, 2011). Una de la bases de datos más utilizada para este tipo de aplicaciones es PubMed, aunque existen colecciones bibliográficas restringidas que utilizan procedimientos de este tipo como Web of Science (Thomson Reuters), o Scimago a partir de la información de Scopus (Elsevier). A la fecha hemos identificado más de un centenar de este tipo de aplicaciones en la web (Michán *et al.*, 2010; Michán *et al.*, en prensa).

Un ejemplo de aplicación de análisis de literatura automático disponible en la web es LigerCat (figura 4), una herramienta que usa etiquetas en nube (*tag clouds*) para proporcionar una visión general de los conceptos más frecuentes. Además, por medio de una gráfica permite identificar la tendencia de publicación por año para una consulta realizada, e incluso puede seleccionar alguna de las barras para revisar los artículos aparecidos en el año correspondiente. Algunas de estas aplicaciones liberan versiones que se pueden ejecutar desde dispositivos móviles (Cobo y Pardo, 2007).



Figura 4. Pantalla de LigerCat mostrando las palabras más ocurrentes (etiquetas de mayor tamaño) y las menos ocurrentes (con un menor tamaño) para documentos de PubMed sobre Gerontología.

### **Colecciones bibliográficas**

Las herramientas más eficientes para búsqueda de literatura son las colecciones bibliográficas especializadas y sistematizadas en una base de datos digital con acceso inmediato; diseñadas con la intención de contener datos ordenados disponibles a través de la web para personas interesadas en su consulta con fines académicos. Definiremos colección bibliográfica o de literatura científica como toda aquella colección que registra documentos de carácter científico, en especial, información sobre artículos y libros. Desarrolladas para proporcionar información útil (Jagarlapudi y Kishan, 2009), estas colecciones se han constituido como una de las herramientas computacionales más desarrolladas en los últimos años.

En los últimos años, el estudio del envejecimiento se ha sumado a la corriente principal de las ciencias biológicas; como evidencia de esa transición, el número de estudios y datos experimentales publicados e indizados en las colecciones bibliográficas ha aumentado de manera exponencial (Kaeberlein *et al.*, 2002; Michán y Michán, 2010; Peyssele y Ricard-Blum, 2011). Con base en la estructura, la organización y los servicios que dan las colecciones bibliográficas biomédicas con información sobre envejecimiento se pueden dividir en las siguientes categorías: 1) biblioteca virtual, 2) sistema de información, 3) índices o catálogos, 4) editoriales

o revistas, y 5) repositorios. Algunos ejemplos de colecciones bibliográficas para la investigación biomédica y relacionadas con el estudio del envejecimiento, están disponibles en línea y se representan en la tabla 1.

### **E-ciencia**

Para referirse a esta nueva forma de hacer ciencia que incorpora el cómputo, se han acuñado términos, los cuales están en boga y describen los cambios contemporáneos de la misma; enseguida se hace mención de algunos de ellos: e-ciencia (*e-science*), e-investigación (*e-research*), ciberinfraestructura (*cyberinfrastructure*) y ciberciencia (*cyberscience*) (NSF, 2007).

La e-ciencia resulta del uso y aplicación de la ciberinfraestructura en la práctica científica a través de la capacidad de colaboraciones globales entre científicos de diversas áreas, con poderosas instalaciones de próxima generación científica (Hey y Trefethen, 2003; Chen, *et al.*, 2007; Rambo, 2009). En la figura 5 se representa el proceso de investigación realizada en el espacio virtual, y la publicación electrónica de los resultados, con las siguientes características: la colaboración internacional inter y multidisciplinaria de un gran número de investigadores (colaboratorios); comunicación global gracias a la ciberinfraestructura (interconexión de computadoras y arquitectura *grid*), almacenamiento (reservorios de

Tabla 1. Ejemplos de colecciones bibliográficas para la investigación biomédica y relacionadas con el estudio del envejecimiento.

datos); la posibilidad de visualizar los datos; desarrollar herramientas y procedimientos basados en Internet. Esto ha permitido a los investigadores realizar una colaboración más rápida y óptima (Hey y Trefethen, 2003; Hey y Trefethen, 2005; NSF, 2007; Rambo, 2009).

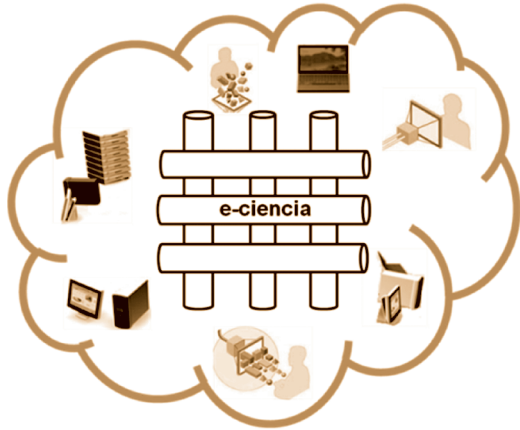


Figura 5. Proceso de la e-ciencia en el espacio virtual.

En la actualidad se han desarrollado proyectos de e-ciencia dirigidos al estudio del envejecimiento (tabla 2), tal es el caso del proyecto *Biology of Ageing e-Science Integration and Simulation System* (BASIS), que se basa en los servicios web para realizar un estudio cuantitativo de la biología del envejecimiento con la colaboración multidisciplinaria de investigadores. Otro es el proyecto *e-Ageing: Western Australian Centre for Health Ageing*, desarrollado por la Universidad de Australia Occidental en conjunto con el Instituto Australiano Occidental para la Investigación Médica, el cual busca mejorar, por medio de tecnologías web, la enseñanza y el aprendizaje referidos al

cuidado de los ancianos.

La ciberinfraestructura que hace posible a la e-ciencia es administrada por especialistas en cómputo y bioinformática, los cuales construyen herramientas y servicios (que pueden ser de carácter restringido o abierto) que permiten a los científicos colaborar, compartir y distribuir información acerca de sus investigaciones (Hey y Trefethen, 2005).

Con base en lo expuesto en este capítulo, los retos informáticos para la investigación molecular sobre envejecimiento en México serían: 1) el diseño y mantenimiento de bases de datos bibliográficas regionales y locales exhaustivas, estandarizadas y actualizadas con acceso abierto y en línea; 2) la publicación de una revista en línea con herramientas de vanguardia; 3) la realización de un repositorio institucional, o incluso nacional, que contenga la literatura publicada en México sobre esta especialidad; 4) el uso y la difusión de las herramientas web de las generaciones 2.0 y 3.0 para manejo de literatura; 5) la adopción y explotación de la ciberinfraestructura disponible para investigación sobre biogerontología; y 6) la aplicación del análisis automático de la literatura. En su conjunto, todas estas herramientas sin duda permitirán la consolidación y modernización de esta disciplina institucionalizada recientemente en nuestro país.

*Agradecemos a Eduardo Álvarez por su colaboración en la discusión sobre algunas aplicaciones. Este texto se hizo con recursos de los proyectos DGAPA, UNAM PAPIME PE 201509 2009-2011 y CONACYT 13276.*

Tabla 2. Dos ejemplos de proyectos de e-ciencia sobre envejecimiento.

1. Ashraf T Information technology and public policy: a socio-human profile of Indian digital revolution. *The International Information y Library Review*, 2004;36(4):309–318.
2. Atlas M C. Retraction policies of high-impact biomedical journals. *Journal of the American Medical Association*, 2004;92(2):242–250.
3. Buckland MK. Information as thing. *Journal of American Society of Information Science*, 1991;42(5):351–360.
4. Budd JM, Sievert M, Schultz T R. Phenomena of retraction: reasons for retraction and citations to the publications. *Journal of the American Medical Association*, 1998;280(3): 296–297.
5. Cobo RC, Pardo KH. *Web Oficial del libro Planeta Web 2.0. Inteligencia colectiva o medios fast food.* Barcelona / México, D.F., 2007.
6. Cohen A M, Hersh W R. A survey of current work in biomedical text mining. *Briefings in bioinformatics*, 2005;6(1):57–71.
7. Cohen T, Widdows D. Empirical distributional semantics: Methods and biomedical applications. *Journal of Biomedical Informatics*, 2009;42(2):390–405.
8. De Magalhaes J, Toussaint O. How bioinformatics can help reverse engineer human aging. *Ageing Research Reviews*, 2004;3(2):125–141.
9. Elbaum S, Rothermel G, Karre S, Fisher M. Leveraging User-Session data to support web application testing. *IEEE Transactions on Software Engineering*, 2005;31:187-202.
10. NSF. *Cyberinfrastructure Vision for 21st Century DisCoVery.* Arlington, V. 2007.
11. Giustini D. Web 3.0 and medicine. *BMJ*, 2007;335(7633):1273–1274.
12. Gore SA. e-Science and data management resources on the web. *Medical reference services quarterly*, 2011;30(2):167–177.
13. Hendler J. Web 3.0 emerging. *Computer*, 2009;42(1):111–113.
14. Hey T, Trefethen A. e-Science and its implications. *Philosophical Transactions A Math Phys Eng Sci*, 2003;361(1809):1809–1825.
15. Hey T, Trefethen AE. Cyberinfrastructure for e-Science. *Science*, 2005;308(5723):817–821.
16. Jagarlapudi SA, Kishan RV. Database systems for knowledge-based discovery. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2009;575:159–172.
17. Kaeberlein M. AGEID: a database of aging genes and interventions. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2002;123(8):1115–1119.
18. Lambiotte R, Panzarasa P. Communities, knowledge creation, and information diffusion. *Journal of Informetrics*, 2009;3(3):180–190.
19. Lindberg DA. Biomedical informatics: precious scientific resource and public policy dilemma. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 2003:114.
20. Meadow C. Measuring the impact of information: Defining the concepts. *Information Processing y Management*, 1997;33(6):697–714.
21. Macías L, Michán L. Los recursos de la web 2.0 para el manejo de información académica. *Fuente*, 2009;1(1):18-27.
22. Michán-Aguirre L, Calderón-Rojas R, Nitxin-Castañeda Sortibrán A, Rodríguez-Arnáiz R. Aplicaciones web para recuperación y análisis de bibliografía de PubMed. *El Profesional de la Información*, 2010;19(3):285–291.
23. Michán L, Michán S. El desarrollo de la biogerontología y Geriatria de inicios del siglo XX a la actualidad. En: *Envejecimiento humano: Una visión transdisciplinaria.* México: Instituto de Geriatria, 2010. ISBN 978-607-460-121-3, 2010; pp. 137-146.
24. Michán L, Muñoz-Velasco I, Alvarez E, Macías L. *Biomedical Web, Collections and Meta-Analysis Literature Applications.* En: *Biomedical Engineering / Book 4*, 2011. ISBN 979-953-307-028-4. En prensa.
25. Nentwich M. *Cyberscience: research in the age of the internet.* Austrian Academy of Sciences Press, 2003:479-489.
26. Peysseon F, Ricard-Blum S. Understanding the biology of aging with interaction networks. *Maturitas*, 2011;69:126-130.
27. Rambo N. E-science and biomedical libraries. *Journal of the Medical Library Association*, 2009;97(3):159–161.
28. Roberts J. From know-how to show-how? questioning the role of information and communication technologies in knowledge transfer. *Technology Analysis y Strategic Management*, 2000;12(4):429–443.



29. Robu I, Robu V, Thirion B. An introduction to the semantic web for health sciences librarians. *Journal of the Medical Library Association: Journal of the Medical Library Association*, 2006;94(2):198–205.
30. Rosenthal A, Mork P, Li MH, Stanford J, Koester D, Reynolds P. Cloud computing: A new business paradigm for biomedical information sharing. *Journal of Biomedical Informatics*, 2010;43(2):342–353.
31. Sinard JH. *Practical Pathology Informatics. Demystifying informatics for the practicing anatomic pathologist*, chap. Chapter 1. The Scope of Pathology Informatics. Springer, 2006:1–17.
32. Walker E, Hernandez AV, Kattan MW. Meta-analysis: Its strengths and limitations. *Cleveland Clinic. Journal of Medicine*, 2008;75(6):431–439.

### **Layla Michán**

Profesora asociada “C” de tiempo completo de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Licenciada en Biología y doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Nacional Autónoma de México. Desarrolló investigaciones posdoctorales en el Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y en el Instituto de Investigaciones Filosóficas de la UNAM. Sus áreas de interés comprenden el análisis de las ciencias biológicas en la actualidad: estructura, desarrollo, tendencias, patrones y relaciones de la investigación biológica reciente (1980-actualidad) desde la bibliometría, historia y sociología de la ciencia; en especial le interesa el impacto de las TICs (web, ciberinfraestructura y colecciones) en las ciencias biológicas, relacionadas y afines. Actualmente está a cargo del Repositorio Institucional de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Blog: <http://laylamichanunam.blogspot.com/>

### **Claudia Itzel Pedraza e Israel Muñoz Velasco**

Son estudiantes de la licenciatura en Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM e imparten cursos sobre e-investigación bibliográfica para Ciencias Biomédicas, información digital para Biología y meta-análisis para literatura biológica.





**IMPRESO EN MÉXICO**

ASPECTOS MOLECULARES DEL  
ENVEJECIMIENTO

Se terminó de imprimir en el mes de mayo de 2012  
en los talleres de Consorcio Editorial  
El León de Shalom, S.A. de C.V.  
Ororya No. 610, Col. Lindavista, C.P. 07300  
México, D.F.  
El tiraje fue de 1500 ejemplares.