

# XI. Restricción calórica y expectativa de vida

ÁNGEL SANTOS RUIZ Y MARÍA CASCALES ANGOSTO

*Académicos de Número*

## 1. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso biológico, complejo e inevitable, que afecta a los organismos vivos, en el que se encuentran implicados factores genéticos y ambientales. A pesar de las importantes consecuencias que el envejecimiento aporta al organismo y a la sociedad, sólo recientemente se ha mostrado un interés real por profundizar en el conocimiento científico de este proceso vital. Es un hecho reconocido el papel que juega la nutrición en la serie de eventos moleculares que conducen a la vejez y también que la restricción calórica de la ingesta aumenta la expectativa de vida, retrasa el declinar de la función inmune típica del envejecimiento y reduce la incidencia del cáncer y la mortalidad en diferentes especies animales. Sin embargo, se conoce poco aún sobre los mecanismos celulares y moleculares que producen estos efectos positivos. El término restricción calórica se refiere a una reducción del contenido calórico de la dieta sin que ello comprometa a los nutrientes esenciales. La teoría, ampliamente aceptada de los radicales libres y el envejecimiento (Harman, 1956) responsabiliza a las especies reactivas del oxígeno, al estrés oxidativo y a la modificación oxidativa de las macromoléculas, del declinar de las funciones fisiológicas en la senectud. Los efectos beneficiosos que aporta el menor contenido calórico de la dieta sobre las alteraciones típicas del estado senescente, se basan en la menor generación de especies activas de oxígeno y de lesiones oxidativas del DNA, con la consiguiente disminución de los defectos a nivel transcripcional, traduccional y post-transduccional.

Se ha observado también que la restricción calórica reduce la incidencia del cáncer. La lesión oxidativa del DNA parece encontrarse

implicada, tanto en el envejecimiento como en el cáncer, jugando la lesión del DNA mitocondrial un papel más importante en el caso de la vejez, mientras que la del DNA nuclear se relaciona más bien con el desarrollo tumoral. La serie de acontecimientos moleculares que conducen a la senectud y/o al cáncer puede ser modificada por el contenido hipocalórico de la ingesta. Como muchos de estos acontecimientos son consecuencia de la capacidad del organismo para superar la acción de agentes estresantes ambientales, es posible establecer una relación entre el contenido calórico de la dieta y el tiempo requerido para la formación de un tumor o la expectativa de vida. Por ello, se ha establecido que a mayor ingesta calórica, mayor peso corporal, mayor incidencia de tumores espontáneos y menor expectativa de vida.

Para entender mejor estos fenómenos hay que estudiar la respuesta del organismo al medio ambiente a distintos niveles: fisiológico, metabólico, celular y molecular.

## 2. DIETAS Y EXPECTATIVA DE VIDA

Como acertadamente ha señalado Varela Mosquera (1993), no es fácil definir lo que debe entenderse por dieta equilibrada, dado que incluso existe algún confusiónismo con la dieta normal o la dieta correcta. En la práctica, las tres denominaciones cabe utilizarlas como sinónimos. Sin duda, la dieta equilibrada ha de depender de las necesidades de energía y nutrientes del individuo, sea joven o viejo, sano o enfermo. Los temas y preocupaciones conectadas con el periodo de vida deben referirse no sólo a la disminución de la masa ósea sino también, a los cambios de la llamada masa muscular activa. Entre otros casos el cociente masa muscular activa y grasa total define bien la composición corporal de las personas en conexión con la edad.

La prolongación de la vida por adecuación de la dieta se ha reconocido mediante estudios en animales. Las primeras investigaciones sobre este tema datan de primeros de siglo (Osborne *et al.*, 1917). Diferentes manipulaciones nutricionales han resultado eficaces en seres vivos, incluidos primates, logrando aumentar el expectativa de vida. En los años treinta McCay y Crowell (1934) mostraron que la reducción de la dieta

prolongaba significativamente el máximo periodo vital en ratas. Dichos experimentos nutricionales han conseguido retrasar y disminuir las enfermedades y los achaques propios del paso del tiempo. Los posibles mecanismos actuantes están aún dentro de un campo especulativo y las sugerencias se refieren principalmente a la reducción del crecimiento, a las alteraciones del ritmo metabólico, a la producción de radicales libres, y al cambio en el *turnover* proteico y en la expresión genética.

Se ha indicado recientemente que el control de la dieta y su subsiguiente acción es poco conocido. No obstante algunos estudios gerontológicos han llevado a varias conclusiones. Así, una reducción de la dieta materna produce en ratas: (a) una caída prematura en la hemoglobina; (b) una suspensión del crecimiento, anemia y tendencia a la hipotermia; (c) alteraciones en la nutrición de la vida prenatal y postnatal temprana con incremento de enzimas asociadas a la edad, en hígado y riñón. Probablemente estas investigaciones suponen el primer avance en cuanto al supuesto que la restricción de la dieta en los primeros momentos de la vida está asociada con la aceleración de la senectud. Se ha demostrado que la alimentación pobre en proteínas influye decisivamente sobre los procesos degenerativos (Barker, 1994; Godfrey *et al.*, 1994).

Ensayos llevados a cabo en niños y seguidos después en su vida adulta, demuestran que el peso bajo asociado a la deficiente nutrición materna se encuentra frecuentemente asociado con diferentes desórdenes, entre ellos cardiopatías coronarias, hipertensión, diabetes no insulínica y obstrucción pulmonar crónica. Trabajos ulteriores aclaran que las deficiencias en el crecimiento provocan señales anticipadas de deterioro en la vista, oído, músculo y piel, desnutrición prematura y procesos patológicos degenerativos (Barker, 1994).

De todo lo anterior se deduce claramente que el ajuste de la dieta es un buen método para conservar la salud y prolongar la vida. Hasta ahora, los conocimientos sobre la adaptación alimenticia en los tiempos prenatales y temprano-postnatales han sido escasos. Sin embargo, la escasa literatura científica existente indica que la reducción nutricional en la primera etapa de la vida tiene consecuencias opuestas a las anteriormente apuntadas, ya que conduce a una aceleración del declive y a una disminución del periodo de vida (Godfrey *et al.*, 1994). Estos ha-

llazgos respaldan la emergente evidencia epidemiológica en el hombre, ya que la alimentación pobre en las primeras etapas vitales conlleva a una serie de procesos patológicos convergentes con la edad (Langley & Jackson, 1994).

La expectativa de vida en los seres humanos ha aumentado notablemente en los últimos tiempos, a través de mejoras en la salud pública, la nutrición, la vivienda y, en general, en la calidad de vida. El promedio vital está ahora principalmente limitado por la senescencia intrínseca, sus fragilidades y las enfermedades asociadas. La comprensión de las bases biológicas del proceso de degeneración representa un gran reto científico, que requiere la integración de conocimientos moleculares, celulares, genéticos y fisiológicos.

El desarrollo de modelos ecológicos para la investigación de la evolución humana es del mayor interés. Estamos aún en el caso de la poca atención prestada a la energética, que es uno de los puntos clave del ecosistema moderno. Se han examinado las correlaciones ecológicas en los requerimientos metabólicos entre especies primates y el uso de la información recogida para aclarar inferencias acerca de los cambios en la demanda de energía en el curso de la evolución humana. Datos sobre el tamaño del cuerpo, metabolismo basal y actividades diversas en especies antropoides seleccionadas y en humanos se han utilizado para estimar la energía total gastada (Leonard y Obertson, 1997). Los análisis llevados a cabo indican que los niveles de energía gastada y los días transcurridos están directamente relacionados con la calidad de la dieta y que las especies más activas tienden a consumir las más ricas. Durante la evolución de los homínidos parece que la energía total gastada aumenta sustancialmente al llegar a la emergencia del *Homo erectus* y el incremento se atribuye particularmente al tamaño corpóreo y al nivel de actividad (Hart y Turturro, 1998).

### 3. RESTRICCIÓN CALÓRICA Y ESTRÉS OXIDATIVO

La hipótesis de que el estrés oxidativo es el factor causal mayor en gran cantidad de procesos en el organismo, a lo largo de los años es, desde luego, válido (Ames *et al.*, 1993; Davies, 1995). De ello se puede

predecir que la restricción calórica de la dieta (RC) bajaría el *status* del estrés oxidativo y retardaría el daño oxidativo asociado a la mayor edad, con aumento del potencial metabólico, lo cual se ha confirmado mediante resultados experimentales (Janssen *et al.*, 1993). Roedores sometidos a RC muestran con el tiempo las siguientes variaciones: disminución de la producción mitocondrial de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); disminución del daño oxidativo; baja de la producción de alcanos; retraso de la pérdida de la fluidez en membranas (Masoro *et al.*, 1982, 1991). Las actividades individuales de enzimas oxidativas en los tejidos no siguen un patrón consistente durante el proceso vital ni tampoco en respuesta a la RC. El grado metabólico expresado en consumo de calorías totales por gramo de peso de cuerpo, se eleva por la RC según estudios llevados a cabo en ratas y ratones hembra. El más alto grado de daño oxidativo así como su atenuación por la RC, se da en tejidos del cerebro, corazón y músculo esquelético los cuales están constituidos por células postmitóticas de vida larga. Estos tejidos son blanco de desórdenes degenerativos relacionados con el paso del tiempo y en ellos está implicado el estrés oxidativo. El contenido de carbonilos proteicos en el cerebro de ratones de quince meses alimentados *ad libitum* puede rebajarse con cinco semanas de RC e incluso subir con alimentación normal y corriente. El efecto de la RC en el estrés y el daño oxidativo en cerebro parece ser rápidamente reversible y reducible.

Fue Harman en 1956, quien propuso por primera vez que las especies reactivas de oxígeno eran las responsables de las alteraciones oxidativas típicas de la edad avanzada. Esta teoría ha alcanzado la mayor aceptación, ya que son diversas las líneas de estudio, puestas en evidencia hasta el momento presente, que llevan al convencimiento de que el daño oxidativo es un hecho común en la senescencia trascendiendo límites filogenéticos (Ceckman y Ames, 1998). En las distintas especies y tejidos las variaciones características en la generación de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  apuntan que el nivel de proporción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) está condicionado genéticamente (Ku y Sohal, 1993; Ku *et al.*, 1993). De modo similar los cambios específicos en los sistemas de defensa antioxidante enzimáticos, como la expresión génica de la Cu, Zn-superóxido dismutasa y de la catalasa junto con la ampliación del periodo de vida en *Drosophila* transgénica implican a genes puntuales

en el control del estrés oxidativo (Orr y Sohal, 1994). La ampliación del máximo periodo de vida en regímenes experimentales mediante la RC en mamíferos y poiquilotermos hipometabólicos, hace descender la generación de ROS, lo que involucra a interrelaciones genéticas en la gobernabilidad vital. Recientemente se ha encontrado que el periodo de vida de mutantes CLK de *Caenorhabditis elegans* va asociado con un fenotipo hipometabólico. Junto a los efectos lesivos de las ROS existe una importante documentación apoyada por otras acciones bien diferentes, tales como la regulación de la expresión genética conectada con su posible misión en procesos ulteriores (Lakowski y Hakimi, 1996, 1998).

El receptor de la dihidropiridina y el de la rizanodina son necesarios para la excitación-contracción del músculo esquelético (Mayhew *et al.*, 1998). En este caso particular las investigaciones han consistido principalmente en determinar si la RC a un 60% de la dieta previene las alteraciones musculares y la expresión de esos receptores en ratas alimentadas *ad libitum*. Se observa en estas condiciones un significativo aumento en la expresión de los receptores, lo que demuestra que la RC preserva las propiedades mecánicas del músculo esquelético de las extremidades posteriores y mantiene el nivel de los receptores estudiados (Figura 1).

El efecto de la RC se ha abordado también sobre la expresión de los genes que intervienen en los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante en hígado de ratones alimentados con dietas restringidas frente a controles. Específicamente se examinó la expresión de enzimas antioxidantes en hígado de ratón: catalasa, glutatión peroxidasa y Cu/Zn y Mn superóxido dismutasas (Rikans y Horbrook, 1997; Sohal *et al.*, 1994). Como indicador del daño oxidativo en tejidos se evaluó la peroxidación lipídica y como marcadores del estrés oxidativo los niveles del mRNA de la ubiquitina y las ubiquitinas conjugadas de alto peso molecular. Los tejidos de animales jóvenes con alimentación restringida presentaban valores más bajos en los mRNA de la catalasa, la glutatión peroxidasa y la ubiquitina. Los valores del RNA de la catalasa fueron más bajos en los animales viejos alimentados *ad libitum* frente a los de menor edad en las mismas condiciones nutricionales. En ratones con dieta restringida la expresión de la catalasa y la glutatión peroxidasa no resultó afectada, mientras que el mRNA de la ubiquitina fue más elevado. No se

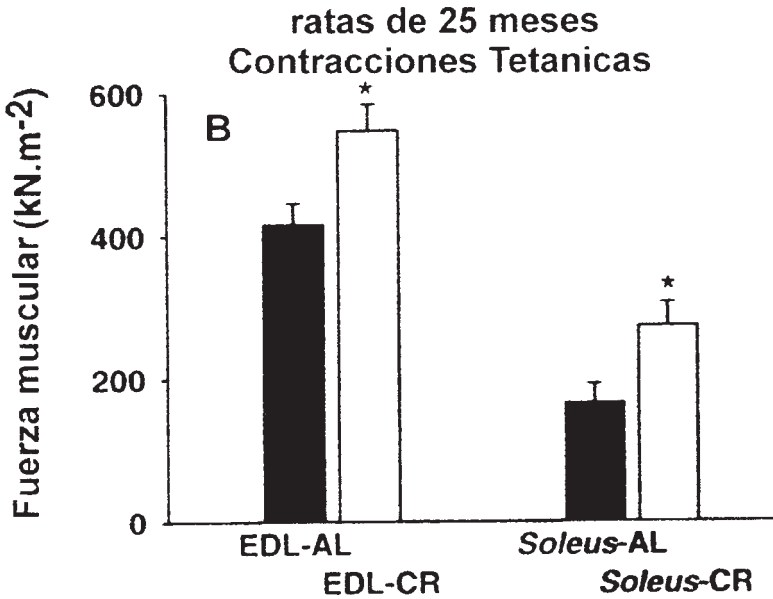
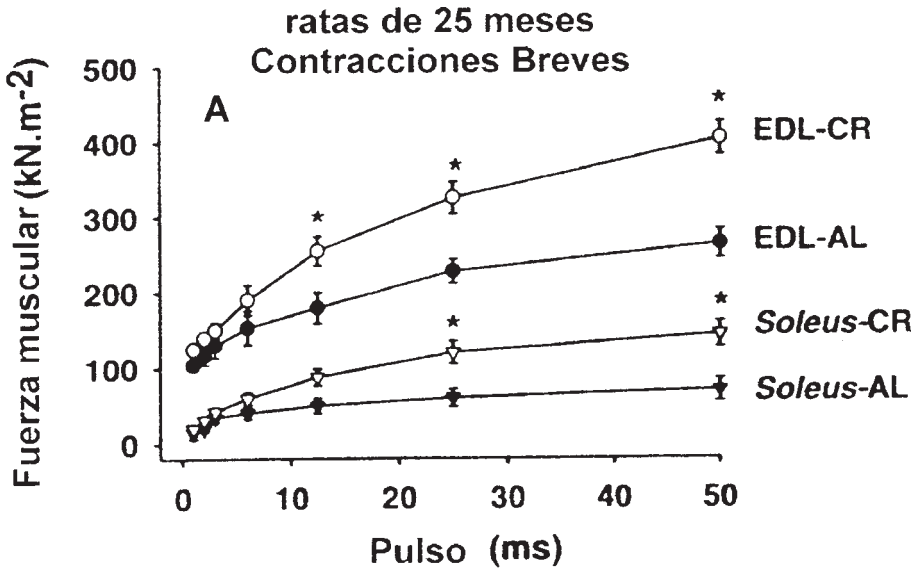


Figura 1. (A) Relación entre la fuerza muscular y la duración del pulso y (B) Tensión tetánica en los paquetes musculares esqueléticos EDL y soleus en ratas F344BNF, de 25 meses con alimentación restringida (RC) y ad libitum (AL). Asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). (Mayhew et al., 1998).

registraron cambios en la expresión de las Cu, Zn y Mn superóxido dismutasas.

La etiología del aumento del estrés oxidativo con la edad depende de diferentes factores: uno de ellos reside en el incremento de la generación de ROS; otro sería un descenso en las defensas antioxidantes; otro más, residiría en la deficiencia en la reparación o eliminación de las moléculas afectadas (Sanz *et al.*, 1997, 1998 y 1999). Las proporciones de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  en la mitocondria, principal lugar de formación, aumenta a medida que transcurre la edad debido a que el deterioro de su membrana interna contribuye a elevar la producción de estas especies. La mitocondria expuesta a diferentes periodos de hiperoxia exhibe un incremento lineal, de producción de  $H_2O_2$ , de proteínas, de daño oxidativo del DNA con medidas verificadas frente a condiciones normales (Sohal *et al.*, 1994). Un mecanismo bien conocido de producción de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  depende de las variaciones en las oxido-reductasas mitocondriales, como el descenso en citocromo c oxidasa y su posterior elevación. El deterioro del DNA mitocondrial es debido al exceso de la concentración de ROS que causa anomalías en los componentes de la cadena de transporte electrónico. No obstante, hay que subrayar que la significación funcional de las reseñadas alteraciones están todavía por demostrar de modo pleno y convincente.

En el proceso habitual de vida no hay constancia de cambios en la actividad de enzimas oxidativos o de concentración de sustancias de bajo peso molecular. Sin embargo, la susceptibilidad de los homogenizados de tejidos y del animal vivo, frente al estrés oxidativo inducido experimentalmente aumenta con la edad, lo que sugiere una caída de las defensas antioxidantes o una mayor capacidad de acción de los iones metálicos de transición que pueden catalizar la escisión del  $H_2O_2$  en radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) altamente reactivo y al que se atribuye ser el principal agente del daño oxidativo (Fridovich, 1978; Halliwell y Gutteridge, 1990). La información actual, acerca de los cambios en la eficiencia de los procesos para reparar o eliminar las moléculas responsables del daño oxidativo es muy fragmentaria. El descenso de la actividad de proteínas enzimáticas neutras o alcalinas, que preferentemente degradan las proteínas, solamente se ha encontrado en ciertos tejidos al cabo del tiempo. Lo que parece claro es que el estrés y el daño oxidativos



aumentan con la elevación de ROS y con la mayor susceptibilidad de los tejidos a la oxidación.

Sin duda, es interesante poder demostrar experimentalmente que la atenuación del estrés oxidativo va asociada a una prolongación de la vida. La disminución experimental del estrés y el daño oxidativo supone una elevación de las defensas enzimáticas antioxidantes y una minimización de la generación de radicales activos.

En individuos de la misma edad, varía el grado de trastornos apreciados y, con ello la «edad fisiológica». Aunque es escasa la información concerniente entre estrés oxidativo y edad fisiológica, en insectos se ha podido constatar una relación inversa entre estos dos parámetros. En la mosca doméstica un indicador de la muerte inmediata es la incapacidad para volar, lo cual ha servido para aislar dos subpoblaciones que difieren aproximadamente en un 30% del máximo lapso de vida (Sohal *et al.*, 1995). Si se comparan las moscas de vida corta con aquellas que la tienen más prolongada se encuentra en estas últimas una baja generación mitocondrial de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ , bajo nivel de daño oxidativo a las proteínas, altas actividades de superóxido dismutasa y catalasa y una elevación en la concentración de glutathione como reductor intracelular versátil. Las variaciones del máximo periodo de vida en las distintas especies están asociadas preferentemente con las diferencias del estado metabólico (consumo de oxígeno), potencial metabólico (cantidad total de energía consumida por gramo de peso), y nivel del estrés oxidativo. Los diversos grupos filogenéticos, tales como dípteros, pájaros, mamíferos varios y seres humanos, poseen distintos potenciales metabólicos (Barja *et al.*, 1994; López-Torres *et al.*, 1997).

Se ha indicado que bastantes mamíferos no primates poseen, un potencial metabólico similar y una relación inversa entre la velocidad metabólica y el máximo periodo vital, el cual se ha definido como «velocidad o grado de vida», que presupone que la intensidad energética condiciona la expectativa de vida. La comparación de un grupo de mamíferos no primates indica que las proporciones de generación de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  en corazón, riñón e hígado están directamente relacionadas con la velocidad metabólica. Por otra parte su relación con el máximo periodo de vida apunta a una ligazón bioquímica entre el concepto de

grado de vida y estrés oxidativo. Aunque las actividades de los enzimas tales como glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa muestran una relación uniforme con el máximo periodo de vida, las especies con una vida más larga son menos susceptibles al estrés oxidativo agudo, conseguido por exposición a los rayos X. Otros experimentos aclaran que la longevidad es inversamente proporcional a la tasa de generación mitocondrial de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  e igualmente a la concentración de carbonilos proteícos (Figuras 2A, 2B y 2C) (Sohal y Weindruch, 1996).

Ciertos seres vivos poseen similares velocidades metabólicas pero diferentes periodos de vida. Tal es el caso del ratón *Peromyscus leucopus* (máximo periodo vital ~ 8 años) y del ratón *Mus musculus* (~ 4 años). La tasa de generación de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  en corazón y cerebro son respectivamente de 40 y 80% más bajas en *Peromyscus* mientras que las actividades catalásica y glutatión peroxidásica eran dos veces más bajas en el *Mus*, no así la concentración de carbonilos proteícos que era un 80% más elevada. La comparación entre pichones (vida media máxima ~ 30 años) y ratas (vida media máxima ~ 4 años), los cuales tienen masa corpórea y velocidad metabólica semejante, confirman que las tasas de generación mitocondrial de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  en cerebro y corazón eran igualmente bajas, mientras las actividades de superóxido dismutasa y de glutatión peroxidasa eran más altas en el pichón. En todos los casos el potencial metabólico y el periodo máximo de vida se relacionaban inversamente con el estrés oxidativo (Sohal *et al.*, 1995).

Hoy día cabe decir que una menor ingestión calórica disminuye la generación de productos que van a ocasionar daño oxidativo en lípidos, proteínas y por supuesto, en el DNA. Este efecto implica un decrecimiento en la producción mitocondrial de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  y un aumento de las defensas antioxidantes (Gomi y Matsuo, 1998). La mayor parte de los daños oxidativos asociados con el envejecimiento, tienen lugar en los tejidos postmitóticos tales como el cerebro, el corazón y el músculo esquelético. A la inversa en estos tejidos se origina una atenuación del daño oxidativo cuando hay una restricción de ingesta de calorías. Las consecuencias funcionales del daño oxidativo en proteínas se demuestra en ratones porque las alteraciones en el cerebro llevan a pérdidas en el conocimiento y en las funciones motoras. Por el contrario la RC retarda

dichas pérdidas y consecuentemente rebaja el daño oxidativo de las proteínas en las regiones cerebrales pertinentes.

#### 4. NUTRICIÓN, METABOLISMO Y CONTENIDO CALÓRICO DE LA INGESTA

En nuestra sociedad postindustrial han surgido nuevas alteraciones de la salud pública provocadas por la inactividad, la sobrealimentación y la obesidad. Concretamente se han realizado esfuerzos considerables para desentrañar las consecuencias fisiopatológicas del exceso alimenticio. Son diversas las líneas de investigación que ponen en evidencia la influencia de la ingesta calórica sobre las enfermedades asociadas tanto en animales como en seres humanos.

Desde 1930 se sabe que la permanente restricción en la dieta en ratas de laboratorio permite que tengan menos enfermedades y al mismo tiempo posean una vida más larga. Cuando en ratones y ratas se reduce el alimento *ab libitum* en un 30 a 60%, la media y la máxima de periodo de vida se incrementa en proporciones parecidas. En animales con ejercicio y un peso del 40% menor que los sedentarios si tiene lugar una ingesta calórica no restringida, aumenta solamente la media del lapso vital. En todos los casos los beneficios de la RC dependen de la prevención de la malnutrición y de la reducción de alimentos más que de sus nutrientes particulares.

Por el momento se sabe de tres regímenes para lograr ampliar el máximo del periodo de vida en animales. El primero sería una baja temperatura ambiente en los de sangre fría (poiquilotermos) y en la hibernación; el segundo abordaría un decrecimiento de su actividad física, acompañado de bajo ritmo metabólico; el tercero supondría la RC. En el caso de insectos, tales como las moscas, el incremento del máximo periodo de vida va asociado a una caída de los niveles mitocondriales de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  y también de proteínas oxidadas y daños oxidativos del DNA (Agarwal y Sohal, 1994). La hibernación en mamíferos como el hámster turco prolonga su vida, lo que sin duda está conectado a un cuadro hipometabólico (Lyman *et al.*, 1981).

Nuestra actual comprensión de las consecuencias de una larga reducción calórica en gente no obesa es relativamente escasa. Estudios epidemiológicos indican que la incorporación de energía y el índice de masa del cuerpo (peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros) está en relación directa con la mortalidad y la incidencia de ciertas enfermedades, si bien estos datos sufren de la dificultad de la evaluación de la ingesta calórica en grandes poblaciones. La relación entre peso corpóreo y mortalidad está sujeta a controversia. Estas discrepancias han sido revisadas en diversos colectivos y se ha encontrado que la mortalidad es baja en participantes con índices de masa corpórea un 15 a 20% por debajo de la media. Los resultados en individuos fumadores y con pérdida de peso aclaran que la gente con menos índice de masa corpórea presentan un riesgo menor de mortalidad (20%). En Japón se ha investigado el efecto de dietas alimenticias con referencia a la asociación entre ingestión calórica y salud. En Okinawa donde la ingestión calórica era la más baja, un 17 y 36% menor a la media en Japón, en adultos y niños, respectivamente, la mortalidad por enfermedades cerebro/vasculares, cáncer y cardiopatías resultó encontrarse por debajo de un 31 a 41%. Estudios llevados a cabo en Suecia demuestran que un alto índice de masa corpórea unido a elevados niveles de ingestión calórica suponen un factor de riesgo para el cáncer de próstata. Con alguna excepción los datos epidemiológicos sugieren que la ingestión calórica esta relacionada directamente con las neoplasias pulmonares, estomacales y colorectales.

Las respuestas fisiológicas a la restricción calórica en individuos de peso medio normal se asemeja a las obtenidas en animales de laboratorio. En un análisis realizado en Holanda en hombres de mediana edad, con un 20% de reducción de su habitual aporte calórico durante diez semanas, se producían las siguientes variaciones: pérdida de un 10% de peso; caída de presión sanguínea diastólica y sistólica; aumento de la colesterolemia y de las lipoproteínas de alta densidad; descenso de la concentración de triyodotironina en suero sanguíneo; baja del metabolismo; y acción beneficiosa sobre los factores fibrinolíticos. Sin embargo, estos individuos no presentaron descensos en la excreción urinaria de 8-hidroxiguanosina a pesar de que en ensayos anteriores se pudo demostrar que estaba estrechamente ligada al nivel metabólico. Numerosas investigaciones responsabilizan al estrés oxidativo en el desarrollo

RESTRICCIÓN CALÓRICA Y EXPECTATIVA DE VIDA

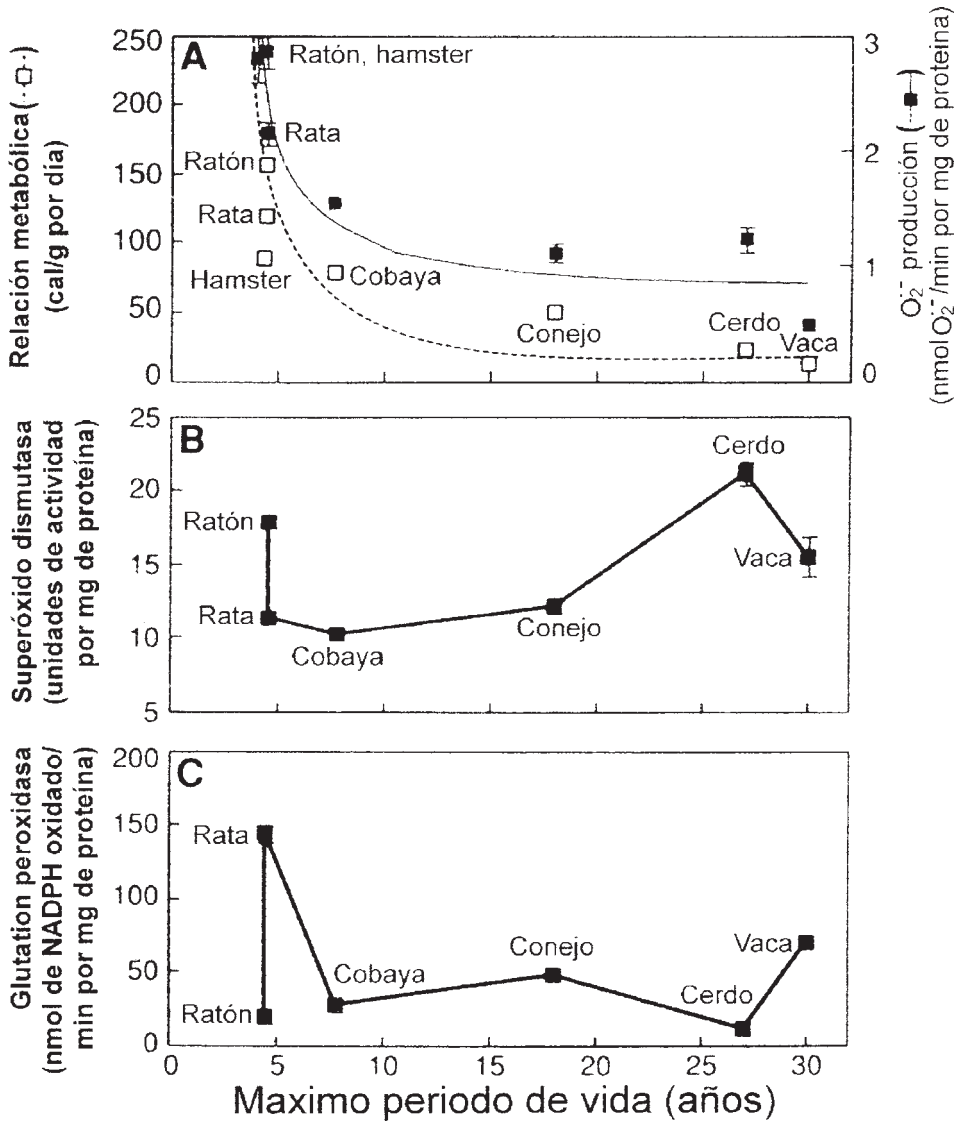


Figura 2. Comparación del máximo periodo vital. (A) Tasa metabólica y de generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por partículas submitocondriales. (B) Actividad Superóxido dismutasa total. (C) Actividad glutacion peroxidasa en corazón de diferentes especies de mamíferos. (Sohal y Weindruch, 1996).

de las enfermedades como el Parkinson, el Alzheimer, las cardiopatías, y otros procesos patológicos degenerativos. Los ensayos en animales con órganos tales como el cerebro y el corazón, cuyo parénquima está constituido por células postmitóticas, ponen de manifiesto que son particularmente susceptibles al daño oxidativo. En consecuencia, el estrés oxidativo y el daño oxidativo pueden ser factores causales del desgaste en la senescencia y de las diferentes enfermedades asociadas y por supuesto, la RC puede atenuar los síntomas.

En contraste con la media del periodo vital, que puede prolongarse cuando mejoran las condiciones ambientales, el máximo de dicho periodo aumenta con el retraso de los síntomas de deterioro. Repetimos que la expectativa de vida en el hombre se ha elevado netamente desde los tiempos prehistóricos como resultado de las mejoras en la salud pública y personal.

En la Figura 3 se muestra en ratones la relación inversa entre ingestión calórica y período vital. El grado de RC está directamente relacionado con la reducción de peso del cuerpo y el aumento de la media y el máximo del lapso de vida. Cuando se restringe la ingesta calórica en ratones de mediana edad el período de vida se alarga. En ratones genéticamente obesos el nivel de consumo de alimentos y no el grado de adiposidad, es el factor clave en la prolongación de la vida. La RC también amplía el periodo vital en especies tan diversas como protozoos, pulgas de agua y arañas. En pollos alimentados *ad libitum* se incrementa la incidencia de enfermedades y se acorta el periodo de vida. En general, el aumento de la vida por RC ha sido confirmado en peces, arañas, y otras especies. Los resultados positivos son indicadores de la estrecha relación entre los síntomas y la ingestión calórica.

Recientemente se han investigado con intensidad las conexiones entre la ingestión calórica, los cambios deletéreos y la mayor longevidad en humanos. Se han efectuado experimentos en primates, principalmente en *Rhesus* y los resultados sugieren que los fenómenos observados previamente en roedores tenían su confirmación ulterior, por ejemplo, hiperglucemia, aumento de sensibilidad insulínica, descenso de la temperatura corpórea y, por supuesto, aumento del máximo periodo vital ligado a RC (Ingram *et al.*, 1990; Kemnitz *et al.*, 1993, 1994; Lane *et*

## RESTRICCIÓN CALÓRICA Y EXPECTATIVA DE VIDA

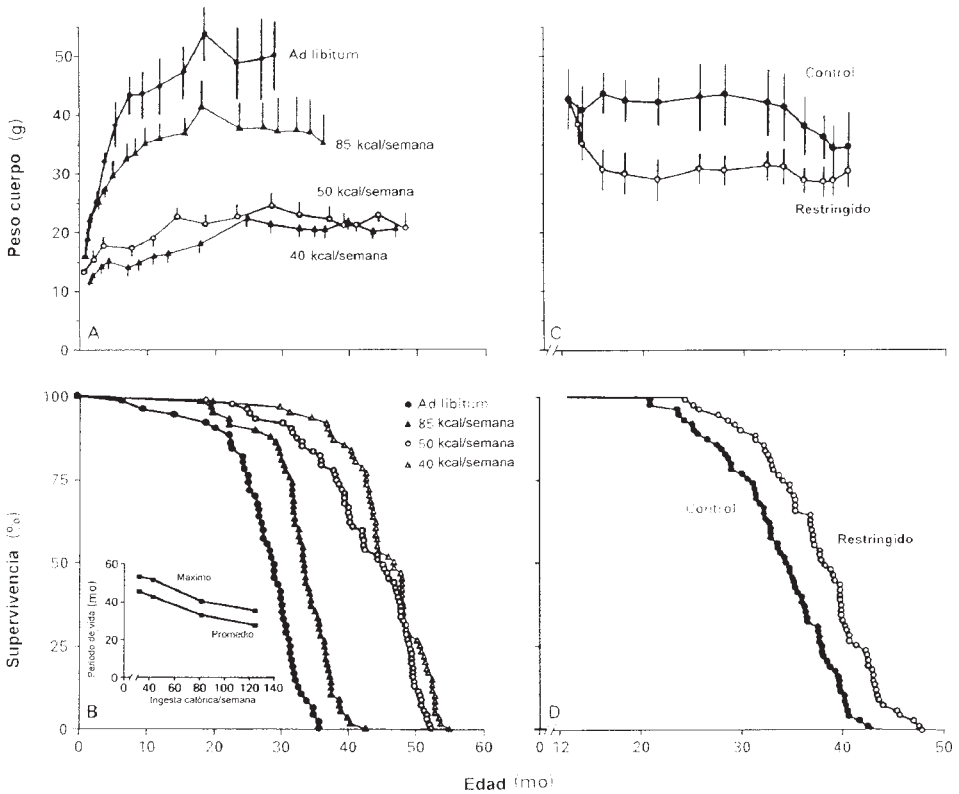


Figura 3. Efecto de la restricción calórica iniciada al mes y a los 12 meses de edad en ratones, sobre el peso corporal y el periodo de vida. (A) y (B) muestran los resultados de hembras de un mes C3B10F1 sometidas a restricción calórica (40, 50 ó 85 kcal/semana). El máximo periodo vital (B) es la media de supervivencia de la más longeva de cada grupo. (C) y (D) muestran resultados de ratones machos de 12 meses B10C3F1 sometidos a restricción calórica (90 calorías/semana) comparados con los controles (160 calorías/semana). La restricción calórica a ambas edades produjo una ampliación en el promedio y el máximo periodo vital. (Weindruch y Walford, 1982).

al., 1996). La restricción calórica de la ingesta lleva consigo un aumento en la longevidad y el consumo de alimentos por encima del nivel óptimo ocasiona un acortamiento del periodo de vida. La práctica habitual en el laboratorio de alimentación de los roedores *ad libitum* promueve obesidad, y un aspecto envejecido unido a patologías varias. Ello obliga a un control exigente de la ingesta calórica en animales de experimentación

en las investigaciones gerontológicas y toxicológicas (Sohal y Weindruch, 1997) (Figura 4).

Además de reducir la mortalidad la ingesta calórica restringida, ayuda a evitar las alteraciones sanguíneas de carácter patológico. En roedores alimentados con una dieta restringida se han examinado las respuestas inmunes, la expresión genética, las actividades enzimáticas, la acción hormonal, la intolerancia a la glucosa, la capacidad de reparación del DNA y los niveles de síntesis proteica. Un 80 a 90% de estos animales exhibía un marcado perfil de retraso del envejecimiento (Bertrand *et al.*, 1980; Lipman *et al.*, 1998). Ciertos efectos de la RC en ratas pueden presentar cambios más bien rápidos; por ejemplo el nivel de corticosterona alto en sangre se consigue en una semana y el aumento de glucosa sanguínea a un 20% después de cinco días, lo cual va acompañado de una caída paulatina de insulina, que a los 21 días del tratamiento fue de alrededor del 50%. Todo esto subraya el rápido efecto que el cambio de dieta ejerce sobre el estado fisiológico. En general cabe admitir que las vías por las que la RC prolonga la vida, van acompañadas, entre otros efectos, de retraso en el crecimiento, reducción de la grasa corpórea, retraso de los cambios neuroendocrinos ó inmunológicos, alteraciones de la expresión genética, incremento de la capacidad reparadora del DNA, estimulación de la apoptosis, depresión del metabolismo y mejora del daño y el estrés oxidativo. Los mecanismos por los que la RC amplía el máximo periodo vital, en los que están involucrados aquellos que provocan una caída del nivel metabólico, han sido objeto de multitud de controversias. Por descontado es de considerable relevancia la relación directa entre el nivel de consumo de oxígeno y la generación mitocondrial de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ . Se ha sugerido que la RC puede ampliar el máximo periodo vital por reducción del nivel metabólico. Una consecuencia reconocida del descenso de temperatura del cuerpo es la reducción del consumo de oxígeno y, lo que es más, la reducción de la concentración de triyodotironina con su repercusión metabólica, que está marcadamente disminuida en roedores sometidos a la RC. Parece posible que la ampliación del máximo periodo vital por la RC en roedores esté asociada a un estado hipometabólico.

Por supuesto, los mecanismos anteriormente indicados varían en tal grado y manera que explican a satisfacción el espectro completo de



RESTRICCIÓN CALÓRICA Y EXPECTATIVA DE VIDA

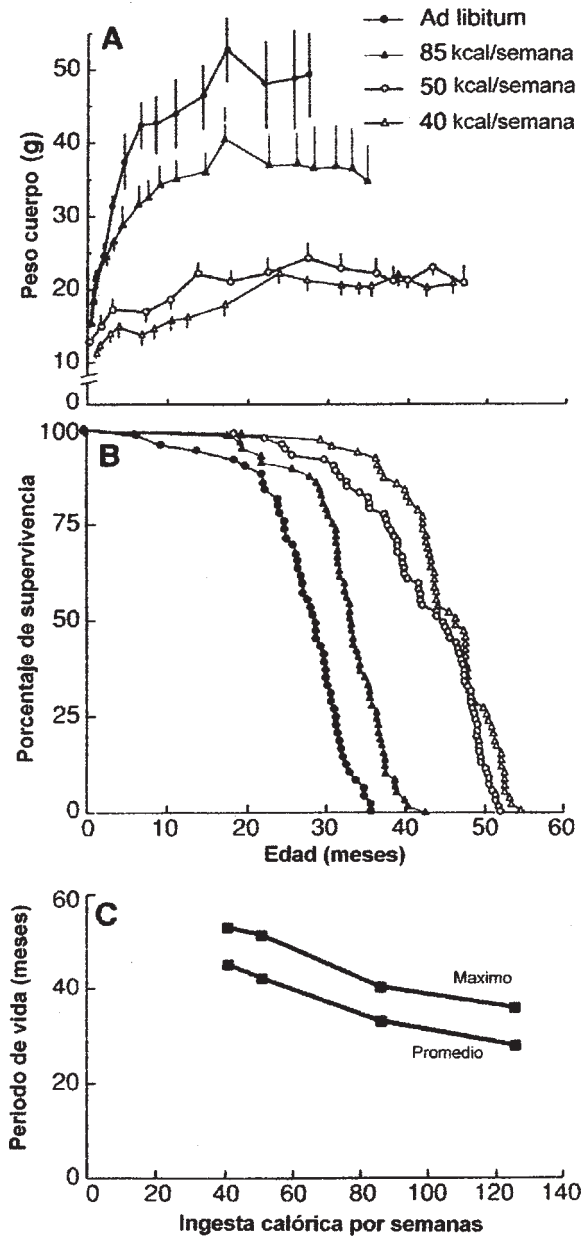


Figura 4. Efecto de la ingestión calórica sobre (A) peso corporal (B) porcentaje de supervivencia y (C) periodo vital en ratones hembras C3B10F. (Sohal y Weindruch, 1997).

alteraciones provocadas por la RC. No obstante, conviene subrayar que no siempre ocurre así, y que algunos resultados arguyen genéricamente contra estas hipótesis.

La glicación proteica y el acúmulo de productos finales de glicosilación avanzada (AGE) se supone que desempeñan un papel importante en el proceso vital. Se producen cambios en la homeostasis de la glucosa, en las proteínas glicosiladas, en la hemoglobina del plasma y en la formación de los productos finales (Novelli *et al.*, 1998; Stadman, 1992). Todo ello ha podido detectarse mediante evaluación de la fluorescencia en la piel y en el colágeno aórtico de ratas macho *Sprague-Dawley* alimentadas *ad libitum* o sometidas a una reducción del 40% de su alimento. En las ratas control la medida de fluorescencia aumenta como una curva exponencial similar, tanto en la piel como en el colágeno aórtico, mientras que las proteínas glicosiladas plasmáticas y la hemoglobina decrecen ligeramente. La restricción en la dieta disminuye el nivel de las proteínas glicosiladas del plasma y de los productos fluorescentes en las ratas más jóvenes solamente y no afecta a la hemoglobina ni tampoco al colágeno aórtico. Todo lo anterior, aclara que la homeostasis de la glucosa no parece desempeñar una misión sustancial en el envejecimiento, no así el colágeno que sube significativamente porque no es sensible a la intervención en la dieta (Figura 5).

La hiperinsulinemia y el aumento de grasa visceral son hechos comunes con el paso del tiempo en el humano. Para examinar las relaciones entre grasa visceral, periférica y la sensibilidad hepática a la insulina se han empleado ratas macho *Sprague-Dawley* de 18 meses de edad; alimentadas *ad libitum* o con moderada RC y se ha observado que la masa total lipídica decrecía aproximadamente un tercio, mientras que la masa corpórea sin grasa permanecía invariable (Barzilai *et al.*, 1998).

En los roedores la restricción calórica retrasa las enfermedades asociadas a la edad, tales como linfomas, cáncer de pulmón y de próstata, nefropatías, cataratas, hipertensión, hiperlipemia y diabetes. La RC previene virtualmente el desarrollo de procesos patológicos autoinmunes en ratones. En diversos casos las respuestas a la RC son muy rápidas sobre la glucosa sanguínea, la insulina, y la concentración de carbonilos (marcador del daño oxidativo en las proteínas). Lo hasta ahora conseguido

RESTRICCIÓN CALÓRICA Y EXPECTATIVA DE VIDA

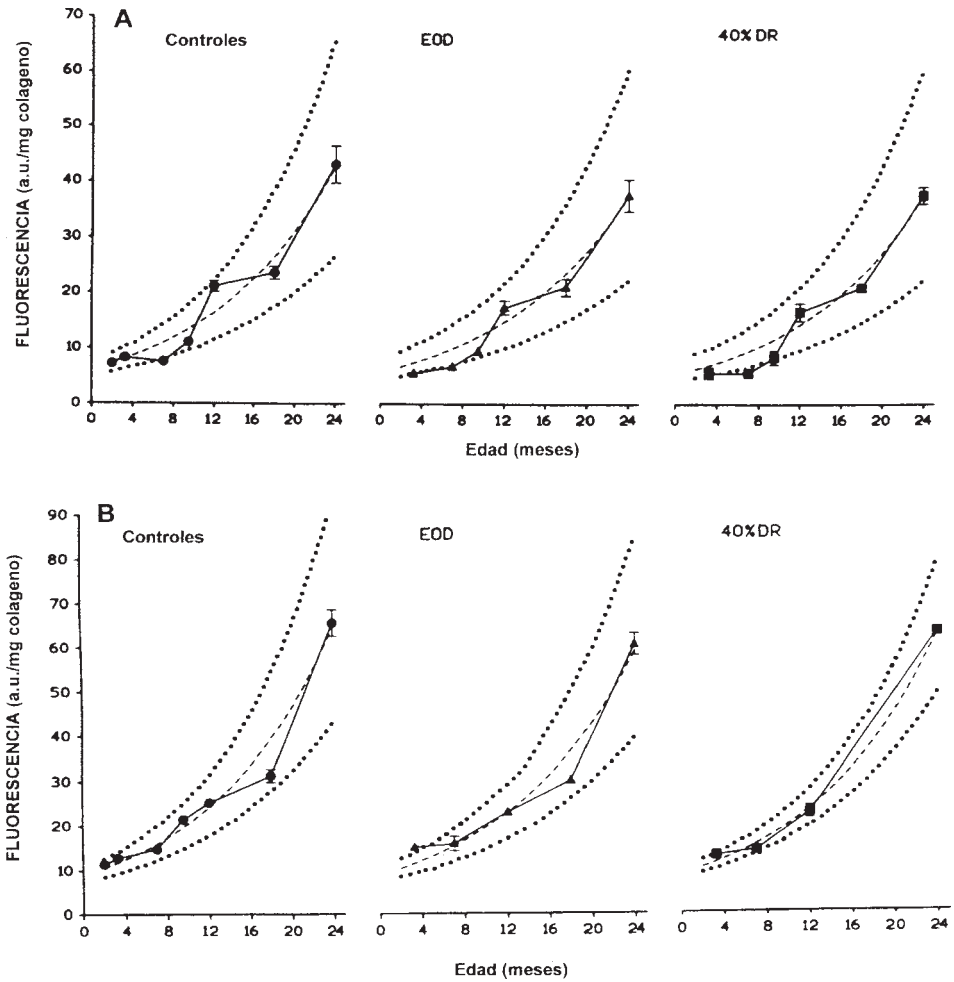


Figura 5. Efecto de la edad y de regímenes dietéticos sobre la acumulación de fluorescencia en colágeno (A) de piel y (B) aórtico en ratas Sprague-Dawley. Los resultados son media  $\pm$  SEM de 4-7 observaciones. Controles ad libitum. EOD (every other day) ad libitum un día sí y otro no. RC 40% de restricción. (Novelli et al., 1998).

aclara que el efecto de la RC puede originarse velozmente, pero también puede disminuir rápidamente en su terminación. Los estudios sobre la RC se han realizado asimismo en primates y los datos conseguidos son similares a los logrados en otros animales, como los roedores, pero son

necesarias investigaciones ulteriores para poder llegar a aplicar todos estos resultados al hombre.

Por descontado que es del máximo interés la identificación de los mecanismos responsables de la multitud de cambios deletéreos característicos del paso de los años, así como la afección de estos procesos por disminución de la ingesta que hace descender el metabolismo basal y la temperatura corpórea en ratas y ratones. El estado hipometabólico en animales va acompañado de una caída (~ 50%) de las concentraciones de triyodotironina en suero sanguíneo. Factores adicionales como el metabolismo graso y el sistema nervioso simpático también se encuentran involucrados en los cambios inducidos por la RC en animales. A principios de siglo Rubner (1908) postuló una relación inversa entre el nivel metabólico y el período de vida en diferentes especies de mamíferos. Estudios ulteriores en animales de sangre fría sometidos a variaciones en la temperatura ambiente, confirmaron la relación inversa entre metabolismo y longevidad. Más recientemente se ha relacionado el nivel metabólico con la liberación de especies de oxígeno parcialmente reducidas que son productos del metabolismo de este elemento químico.

Investigaciones pertinentes han servido para demostrar que el metabolismo, usualmente expresado por el consumo de oxígeno por unidad de masa de cuerpo, decrece en primates y en ratas después de una larga dieta restringida. Es de destacar que la composición del cuerpo y el peso de los órganos de los animales con ingestión calórica restringida difieren de los controles. Las ratas con ingesta calórica restringida tienen un 70% menos de grasa corpórea que los controles y proporcionalmente más pequeño el corazón, hígado, riñón, próstata y bazo y menos masa de músculo esquelético, mientras que los pesos de cerebro y testículo son semejantes a los normales. La RC también reduce de manera notable el peso y el número de células del tejido linfático. El control metabólico y la RC, basados en la masa total corpórea, enmascara las variaciones específicas de los órganos debido a las diferencias de consumo de oxígeno en los distintos órganos. Las diferencias en los niveles metabólicos en animales control y los sometidos a la RC afectan a la cantidad de oxígeno necesario para la energía metabólica. Por ejemplo, en ratones con ingesta calórica restringida el cambio en el metabolismo proteico se detecta por una mayor actividad de la carbamil fosfato sintetasa hepática.

ca, enzima mitocondrial que cataliza la condensación del carbamil fosfato a partir del amonio y bicarbonato, dos productos en el catabolismo proteico.

Es de insistir en el amplio respaldo que ha tenido la teoría de Harman (1956) referente a que el daño a macromoléculas infligido por los metabolitos reactivos del oxígeno es la principal causa del deterioro en el envejecimiento. El irreversible declive de los organismos en la última parte de su existencia refleja el acúmulo del estrés oxidativo, cuya magnitud cuenta inexorablemente en las variaciones del periodo de vida entre individuos de la misma especie. La mayor edad en los seres vivos está estrechamente condicionada a la RC, la hibernación y la baja temperatura corpórea y sanguínea, todo ello atribuible a la atenuación del estrés oxidativo. Con la edad, en gran variedad de especies, aumentan las alteraciones tisulares de carácter oxidativo, en proteínas, lípidos y DNA. Como es sabido el daño oxidativo en proteínas se eleva con el paso del tiempo, tanto en mamíferos como en insectos, por carbonilación, pérdida de grupos sulfhidrilos y disminución de acciones enzimáticas selectivas. El daño del DNA se mide por la cantidad de 8-hidroxidesoxiguanosina. Por descontado, que las razones primordiales del envejecimiento se asocian al incremento del daño oxidativo con mayor producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno en mitocondrias, a su vez, unido a una falta de defensas. Una relación directa entre el estrés oxidativo y las alteraciones oxidativas ha sido hallada mediante investigaciones con la mosca transgénica de la fruta (*Drosophila melanogaster*) en la que las enzimas Cu-Zn superóxido dismutasa y catalasa, eliminan el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno formando así la primera línea de defensa contra el daño oxidativo. Estas moscas transgénicas presentan defensas, que van a reportar un menor daño oxidativo del DNA y de las proteínas, que va acompañado de un 34% de mayor longevidad. Los estudios comparativos entre mamíferos e insectos señalan que los más longevos generan menos anión superóxido y peróxido de hidrógeno y resisten experimentalmente el estrés oxidativo inducido. En los pájaros se da un alto metabolismo y sin embargo, una vida larga y ello parece ser debido a la baja producción mitocondrial de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  y a sus relativamente altas actividades en superóxido dismutasa y glutathion peroxidasa (Barja *et al.*, 1994).

## 5. APORTE CALÓRICO Y LONGEVIDAD

Un informe del Comité Consultivo Nacional de Ética Francés define el envejecimiento como un proceso continuo, natural, ineluctable, con una serie programada de mecanismos biológicos que se suceden a ritmos diferentes, tales como el desarrollo, la madurez y la senescencia, que a lo largo de los años transforman un sujeto adulto de buena salud a otro avejentado y frágil donde las reservas energéticas disminuyen. El viejo se hace, cada vez más vulnerable a las enfermedades y, por tanto, es susceptible de un descenso rápido. La dificultad de definir biológicamente la vejez resulta cuando se observan grandes diferencias entre gentes de la misma edad, contrariamente a la descripción de la sola longevidad que es cronológica.

La interacción entre el medio y el genoma parece desempeñar una misión importante en el envejecimiento. Sin duda hay una relación entre el nivel cultural y socio-económico y el envejecimiento relativo y la resistencia a éste. El progreso y la educación suponen un hacer preventivo y actúan sobre el entorno para atenuar los contrastes. No obstante, a pesar de los logros alcanzados en la calidad de vida, la supervivencia presenta un máximo infranqueable, consecuencia del acúmulo en las células y en los tejidos de alteraciones y lesiones irreparables. El fin de la vida se caracteriza generalmente por la llegada de polipatologías, de un estado de dependencia más o menos acentuado y en multitud de casos de una gran soledad.

Desde hace ya bastantes años se conoce que el descenso de la ingesta de calorías, sin llegar a la malnutrición, lleva a una ampliación del máximo periodo de vida sin conocimiento de las causas. Hoy día se ha utilizado la RC como régimen modelo, sin llegar a comprender aún bien los mecanismos básicos del envejecimiento. Esto se debe principalmente a que la RC origina una evidente y reproducible ampliación de la vida y retrasa sincrónicamente ciertos cambios bioquímicos y de comportamiento asociados a la senescencia.

El estudio analítico de la restricción de la dieta y sus efectos en el periodo vital en un contexto evolutivo o evolucionario representa en el acortamiento de las energías no alimentarias, una mayor eficiencia en la

utilización de los alimentos, más actividad de adquisición de alimentos, un periodo de vida más amplio y también protección de la integridad genómica. Según Hart y Turturro (1998) todo esto resulta de la «Teoría de los procesos relacionados de la longevidad adaptativa», acerca de los efectos de la modulación dietética sobre una mayor protección de la integridad genómica de las células. Estos y otros efectos, se han discutido en el contexto de la metáfora «nave espacial» (spacecraft) para la evolución de la senescencia.

Todavía, en nuestro tiempo, el proceso del envejecimiento supone un enigma y los conocimientos científicos referentes a las causas de tal fenómeno vital están aún en sus principios. Los modernos gerontólogos y nutriólogos han abordado el paradigma de la RC como uno de los mejores caminos para retardar el deterioro funcional y el avance de las enfermedades asociadas a la edad avanzada. En las pasadas dos décadas se han realizado extensas e intensas investigaciones enfocadas a conocer con exactitud las acciones antivejez de la RC con la esperanza de llegar a saber de los factores que contribuyen a los mecanismos de la senectud. Sin duda, el paradigma de la RC ha llevado a eliminar una serie de teorías relacionadas con el pensar gerontológico. Muchas hipótesis, basadas en observaciones epifenoménicas no están acordes con el efecto antienvjecimiento de la RC y, por tanto, deberían ser descartadas. La teoría del estrés oxidativo es una excepción extraordinaria que ha respaldado a la de la RC. El uso de la RC como medida antioxidativa contra el estrés es una notable y efectiva intervención en cuanto que no hay otra conocida que posea tan diversas acciones. Experimentalmente se ha confirmado la capacidad de la RC para atenuar la oxidación proteica (Agarwal y Sohal, 1996; Youngman *et al.*, 1992), el daño oxidativo del DNA (Richten, 1995; Sohal *et al.*, 1994) y la peroxidación glucídica y lipídica (Rikans y Hornbeook, 1997). Basado en estos hallazgos se ha indicado que la capacidad de atenuación del daño oxidativo debe estar en estrecha conexión con la repercusión antienvjecimiento de la RC.

Un hecho común en el ciclo vital de casi todos los organismos multicelulares es el progresivo declinar en la eficiencia de los procesos fisiológicos, una vez que cesa la fase reproductora. Para comprender la naturaleza de los mecanismos que tienen lugar durante el fenómeno de

la senescencia se han utilizado distintas estrategias y modelos, ya que la hipótesis causal debería explicar lo siguiente:

- por qué los organismos al final de su vida experimentan ese declive fisiológico progresivo e irreversible;
- por qué la esperanza de vida en la senectud varía dentro y entre las especies;
- por qué la RC retrasa los cambios fisiológicos y patológicos asociados a la mayor edad y aumenta la media de vida en los animales.

Es importante profundizar en el conocimiento de los efectos de la RC calórica por sus implicaciones en la salud del ser humano.

Una hipótesis sobre el envejecimiento se basa en que el oxígeno es un elemento potencialmente tóxico y aunque en los seres aerobios es necesario para su supervivencia inmediata, sin embargo es peligroso para una existencia larga (Harman, 1956). La toxicidad relacionada con lo que se denomina «paradoja de la aerobiosis» (Davies, 1995) es inherente a su estructura atómica. El oxígeno molecular es un birradical que por adición de un solo electrón genera secuencialmente moléculas parcialmente reducidas como  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$ , las que por ulteriores reacciones pueden favorecer y atraer especies reactivas del oxígeno adicionales y provocar daños oxidativos extensos en las macromoléculas biológicas (Fridovich, 1978; Prior, 1978). Las alteraciones se manifiestan, entre otras, por peroxidación en la membrana de las cadenas de los ácidos grasos poliinsaturados (Chen y Yu, 1994), modificaciones del DNA, carbonilación y pérdida de sulfhidrilos en proteínas (Sanz *et al.*, 1998 y 1999). Las modificaciones de las proteínas por carbonilación sucede en ciertos residuos de aminoácidos presentes cerca de los lugares de unión con metales y produce inactivación enzimática y aumento de la proteólisis (Halliwell y Gutteridge, 1990).

La oxidación en las células aerobias no es trivial y se estima que, en condiciones normales, aproximadamente del 2 al 3% del oxígeno consumido genera  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ . Una célula típica de rata puede sufrir un ataque diario de unas 100.000 ROS y en determinadas condiciones cerca de un 10% de las moléculas proteicas experimentan modificaciones



carbonílicas. Puede hoy decirse que la presencia de productos resultantes de las ROS (interacciones con macromoléculas) conduce a la convicción de que las defensas antioxidativas no son plenamente eficientes, que las células están crónicamente bajo estrés oxidativo y que el envejecimiento es una consecuencia del daño oxidativo.

El paralelismo entre consumo de oxígeno y envejecimiento se cree que implica a metabolitos resultantes del metabolismo de dicho elemento químico. El anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), son fácilmente permeables y a través de las membranas pueden virtualmente entrar en todos los compartimentos celulares (Ku *et al.*, 1993). La escisión del peróxido de hidrógeno, catalizada por el catión ferroso ( $Fe^{2+}$ ) libre o combinado con otro metal de transición reducido, forma una de las moléculas más reactivas, concretamente el radical libre hidróxilo ( $\cdot OH$ ), que es un agente predominante en el daño macromolecular de proteínas, DNA y lípidos (Sohal y Weindruch, 1996). En general el daño oxidativo parece ser específico y dependiente del peróxido de hidrógeno y del metal de transición reducido. Macromoléculas, que contienen metales de transición como la aconitasa, tienen en estos procesos un destacado protagonismo. Aunque las células poseen defensas antioxidativas, los metabolitos del oxígeno son detectables en condiciones normales. Hay que pensar que las células probablemente están bajo un continuo estrés oxidativo a causa del innato desequilibrio entre la generación y la inactivación de las especies reactivas del oxígeno. Estas especies pueden causar pérdidas de la actividad enzimática, inducir mutaciones y lesionar las membranas celulares. No obstante, también poseen funciones útiles tales como la modulación del estado redox celular, la transducción, la activación de factores de transcripción de genes y la apoptosis.

La idea básica relacionada con la hipótesis del estrés oxidativo en la senescencia reside en que la pérdida de función se debe al progresivo e irreversible daño oxidativo molecular. En relación con esta manera de pensar las causas del envejecimiento serían las que se exponen a renglón seguido:

- a) El nivel del daño oxidativo aumenta;
- b) La expectativa de longevidad crece cuando baja el daño oxidativo;

- c) La mejoría en el daño oxidativo va paralela a la prolongación de la vida en mamíferos con dietas bajas en calorías.

Queda pues claro, una vez más, que el estrés y daño oxidativo aumentan con el envejecimiento.

En los estudios sobre senectud no se emplea la medida *in vitro* de la generación de ROS, debido, entre otros inconvenientes a su baja concentración, su naturaleza transitoria y a las defensas antioxidativas. En consecuencia, lo recomendado es medir la concentración de productos originados por la reacción de las ROS con macromoléculas que informan del estado redox en tejidos. Tanto en insectos como en mamíferos el cociente prooxidante/antioxidante se eleva significativamente en parejas tales como GSSG/GSH + HSG, NADPH/NADP<sup>+</sup> y NADH/NAD<sup>+</sup> las cuales tienden hacia valores prooxidantes en la vejez. Un aumento asociado a una mayor edad en el nivel *in vivo* del estrés oxidativo está ligado a una elevación en la exhalación de alcanos como etano y n-pentano originados por la peroxidación por las ROS de los lípidos de la membrana.

En el envejecimiento tiene lugar un aumento exponencial en la concentración de proteínas dañadas oxidativamente (Youngman *et al.*, 1992) por carbonilación, pérdida de grupos -SH y de la actividad catalítica enzimática particularmente susceptible, cual es el caso de la glutamina sintetasa y de la alcohol deshidrogenasa. Un indicador en estos casos del daño oxidativo en el DNA es el aumento en varios tejidos de la 8-hidroxidesoxiguanosina. Un punto emergente y principal en el conocimiento concerniente al daño oxidativo en la senectud es que durante el avance de ésta también lo hace aquel hasta el límite de la muerte. Si el daño oxidativo es un factor fundamental en el envejecimiento también la progresión de la senescencia es exponencial.

La regulación de la expresión de la proteína del choque térmico 70 (*Heat Shock Protein 70*», HSP-70), es un excelente ejemplo de mecanismo celular que tiende a proteger a los organismos vivos de distintos tipos frente al estrés fisiológico (Heydari *et al.*, 1996). Las alteraciones, relacionadas con la edad, sobre la posibilidad de las células de expresar las HSP-70 en respuesta al estrés, puede comprometer seriamente al organismo senescente, en relación a los cambios en su entorno o medio

ambiente. Como la RC es la sola manipulación conocida para retardar el envejecimiento y aumentar la supervivencia en roedores, era de interés analizar su efecto en diversas alteraciones, concretamente en la inducción por calor de la expresión de las HSP-70 en hepatocitos de rata. Por ello se determinó en estas células, la transcripción del gen HSP-70 en respuesta a diversos niveles de calor, encontrando que con la edad declina la transcripción del HSP-70. A todas las temperaturas estudiadas la menor transcripción del gen HSP-70 en animales viejos resultó ser revertida por RC. El factor de transcripción del choque térmico (*Heat Shock Transcription Factor* = HSF) media en la transcripción del HSP-70 inducida por el calor. Es sabido que el HSF existe en dos formas: monomérica inactiva y oligomérica activa. Se ha observado que la inducción por calor del factor HSF no experimenta variaciones por efecto de la edad, lo cual indica que si a una concentración igual de HSF la expresión de la HSP-70 es menor, ello ha de ser debido a que los animales viejos poseen menor concentración de HSF oligomérico activo. Esto hace que la capacidad del factor de transcripción HSF de unirse al promotor del gen *hsp70* sea menor y con ello la transcripción de dicho gen. Se ha descrito que la RC revierte el efecto del envejecimiento sobre la inducción por calor de la HSP-70 y ello ha de ser debido a un efecto preventivo sobre la acumulación de moléculas inactivas del factor HSF que normalmente se encuentran en ratas de avanzada edad alimentadas *ad libitum*. Estas investigaciones sobre el influjo de la RC en la expresión de la HSP-70 y la activación del HSF se deben fundamentalmente a experimentos del grupo de Heydari (1996) (Figura 6).

Tanto en animales como en el hombre se ha podido demostrar que el envejecimiento va asociado a una debilitación de la función inmunitaria (Chen *et al.*, 1998). Las teorías al respecto admiten que las variantes de oxígeno reactivo, las ROS, mediante daños a macromoléculas biológicas, deben contribuir a alterar la respuesta inmunológica durante el envejecimiento. Se han realizado estudios, en plasma sanguíneo y en esplenocitos, que comparan los niveles de peroxidación lipídica, la modificación oxidativa de proteínas y la inducción de la proliferación de linfocitos T en ratas macho Fischer 344 xBMF, alimentadas *ad libitum* y con restricción calórica, de edades de 5, 18 y 31 meses (Tian *et al.*, 1995). Los resultados muestran que las ratas *ad*

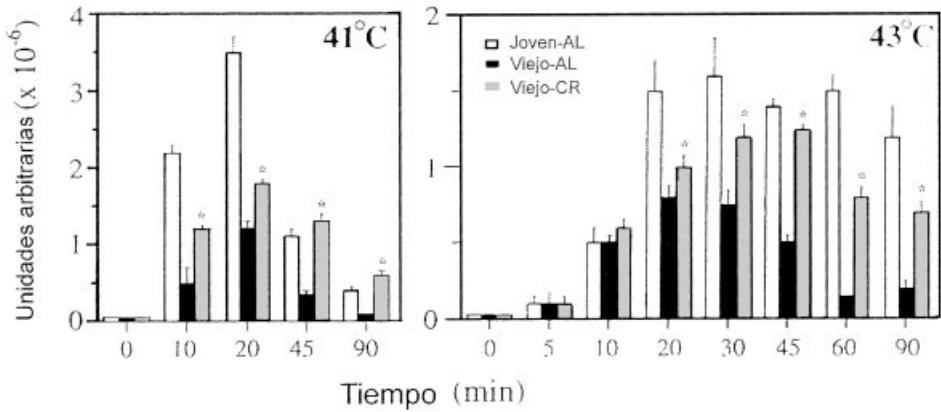


Figura 6. Efecto de la edad y la RC sobre la inducción de la transcripción de la HSP70. Hepatocitos aislados de ratas de 6 y 24 meses alimentadas ad libitum y de 24 meses alimentadas con dieta restringida se incubaron a 41 °C y 43 °C. A diversos tiempos se aislaron los núcleos y se midió la transcripción de la HSP70. Cada punto representa la media  $\pm$  SEM de los datos obtenidos de 3 experimentos.  $P < 0.01$ . (Hedari et al., 1996).

*libitum*, a medida que transcurre la edad presentan un decrecimiento en la respuesta proliferativa de linfocitos esplénicos frente al estímulo mitogénico de la fitohemoaglutinina o de la concanavalina A. Este declinar funcional en linfocitos durante el envejecimiento está inversamente relacionado con los valores de peroxidación lipídica y carbonilos proteicos en el plasma y en los linfocitos del bazo. La RC sin embargo, puede revertir parcialmente el descenso en la proliferación de linfocitos T dependiente de la edad y reducir significativamente la peroxidación de lípidos y el contenido de carbonilos proteicos en plasma y en esplenocitos. Las observaciones anteriores, apoyan el supuesto de que con la edad declina la función inmune que está relacionada con la modificación oxidativa de macromoléculas biológicas, las cuales pueden conducir a inactivaciones enzimáticas, disrupción de membranas y senescencia celular. Uno de los mecanismos por el que la RC revierte el declinar de la función inmune debido al envejecimiento, se admite que puede ser a través de la caída en la generación de ROS, lo que conllevaría a una protección de las macromoléculas celulares contra el daño oxidativo (Figura 7).

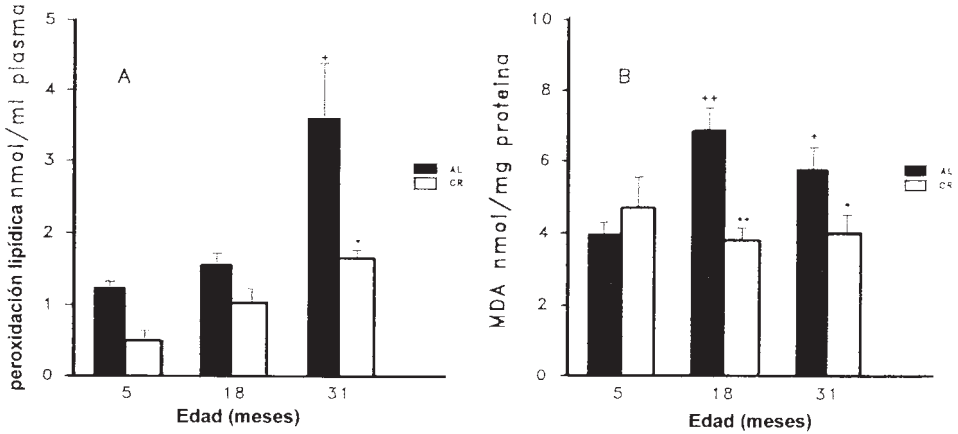


Figura 7. Efectos de la edad y la RC sobre la peroxidación lipídica en (A) plasma y (B) linfocitos esplénicos. Los resultados expresados como media  $\pm$  SEM de 4-6 ratas (plasma) y 10 ratas (esplenocitos), respectivamente.  $p < 0,05$ . (Tian *et al*, 1995).

Es sabido que la restricción de la dieta previene una plétora de enfermedades asociadas a la edad, incluido el cáncer. El grupo de Mehendale (Ramaiah *et al.*, 1998) ha investigado acerca de si la dieta restringida protege contra la hepatotoxicidad de la tioacetamida y, asimismo, la índole del proceso. Ratas macho *Sprague-Dawley* de 2-3 meses fueron mantenidas con un 65% de una dieta *ad libitum* durante un periodo de tres semanas y, al cabo de este tiempo, se trataron con una sola y baja dosis de 50 mg/Kg de tioacetamida. Las enzimas alanina aminotransferasa y sorbitol deshidrogenasa séricas, así como el glucógeno hepático y la incorporación de  $^3\text{H}$  timidina en el DNA nuclear hepatocelular, fueron medidas durante un periodo de cero a ciento veinte horas después de la administración de tioacetamida; la histopatología hepática presentaba una progresión del ciclo celular por proliferación inmunohistoquímica del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). En las ratas con dieta restringida se inició la necrosis hepática a las 12 horas, subió al máximo a las 24 h, persistió hasta las 72 horas y se resolvió hacia las 96 h. Algo semejante sucedió con las ratas *ad libitum*, pero el máximo efecto lesivo se produjo en los animales con dieta restringida, reflejado por la intensidad de la necrosis que fue seis veces superior que en hígado de ratas alimentadas *ad libitum*. La evo-

lución de las lesiones observadas histopatológicamente fue paralela en los dos grupos de animales. Los ensayos referentes al antígeno nuclear de proliferación celular revelaron, en las ratas con restricción de la dieta, un alto estímulo en la progresión del ciclo celular, índice de una mayor proliferación celular compensatoria de regeneración hepática. Los experimentos letales, con administración de 600 mg de tioacetamida por kilo, permitieron detectar que la supervivencia de de las ratas fue de un 70% en el caso de dieta restringida frente a un 10% en las alimentadas *ad libitum*. Aunque la restricción de la dieta incrementó el daño hepatotóxico, sin embargo, protegió del efecto total, al favorecer plenamente la rápida reparación del tejido hepático, lo que permitió salvar a estos animales en contraste con los alimentados *ad libitum* en los cuales el daño hepático llegó a culminar con la muerte (Figura 8).

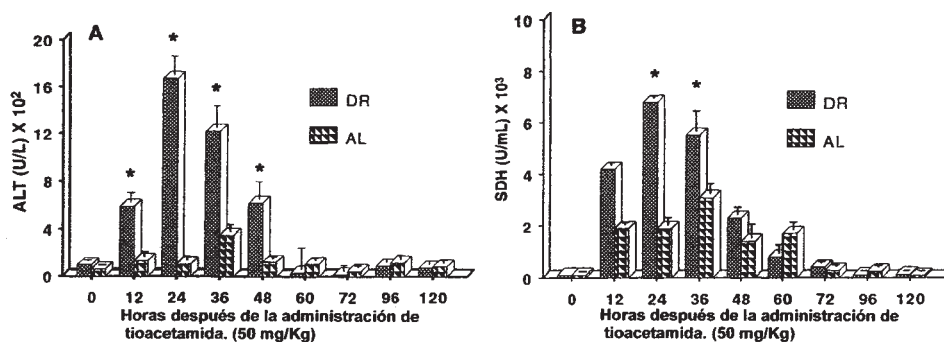


Figura 8. Actividades (A) Alanina aminotransferasa y (B) sorbitol deshidrogenasa plasmáticas en ratas *ad libitum* y con dieta restringida, tratadas con tioacetamida (50 mg/Kg ip). \* Diferencia significativa entre el grupo restringido frente al *ad libitum*. (Ramaiah et al, 1998).

El declinar de la sensibilidad hepática a la insulina se manifiesta por una marcada resistencia hepática a la insulina, propia del envejecimiento. Se ha observado una restauración de dicha sensibilidad cuando los animales fueron sometidos a RC, no así la sensibilidad a la insulina periférica que se mantuvo inalterable. Una cierta infusión de insulina mantuvo la producción de glucosa hepática basal y ésta decreció con una RC adecuada. Cuando se incrementó el contenido calórico la grasa visceral abdominal lo hizo también rápida y selectivamente y se indujo

una intensa resistencia insulínica hepática. Se ha sugerido recientemente (Barzilai *et al*, 1998) que en este modelo el decrecimiento asociado a la acción insulínica hepática (más bien que a la periférica) es el mayor determinante de la hiperinsulinemia y que el aumento de la adiposidad visceral cumple una misión importante en la inducción de la resistencia insulínica hepática. Todo aquello que prevenga la acumulación de grasa visceral abdominal representa un medio efectivo para mejorar el metabolismo glucídico.

En ratones de diferentes edades se ha investigado sobre los cambios relacionados con la edad en sangre periférica, bazo y timo, alimentados *ad libitum* y con RC (Chen *et al.*, 1998). El objeto era definir como la RC retrasa el declinar de la función inmune que ocurre en el envejecimiento. Una restricción de la dieta del 25%, iniciada después del destete, revertió dicha disminución, en las proporciones de linfocitos T, auxiliares T nativos, y linfocitos T citotóxicos en sangre periférica. La concentración de este tipo de células en dichos ratones con dieta restringida supusieron un 161%, 176% y 250% en comparación con los controles alimentados *ad libitum*. La restricción de la dieta en ratones viejos hizo desaparecer la esplenomegalia, bajar el número total de esplenocitos y preservar las células del timo, pero no evitó la disminución de su tamaño. Estos animales frente a los controles poseen dos veces el total de timocitos, y dos con seis veces de timocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> inmaduros. La correlación entre el total de timocitos inmaduros y la concentración de células T auxiliares y linfocitos T citotóxicos aumenta con la edad y es significativa en los ratones viejos. La restricción en la dieta preserva a los precursores de las células T en el timo inmaduras durante el envejecimiento y mantiene altas concentraciones de células T auxiliares y células T nativas circulando en la sangre periférica (Figura 9).

Se ha estimado recientemente que un cierto grado de pérdida de la masa ósea es inevitable a medida que transcurre la edad, Para prevenir un exceso en dicha pérdida, es aconsejable conocer lo que puede influir en ella. Entre los factores de riesgo que conlleva a la osteoporosis están los genéticos, los tipos de vida, los nutricionales, las alteraciones óseas, las distintas terapias y otros posibles causantes. Los factores causales han sido localizados en su mayor parte en estudios epidemiológicos, aunque pocos de ellos, exceptuando la deficiencia estrogénica, han sido

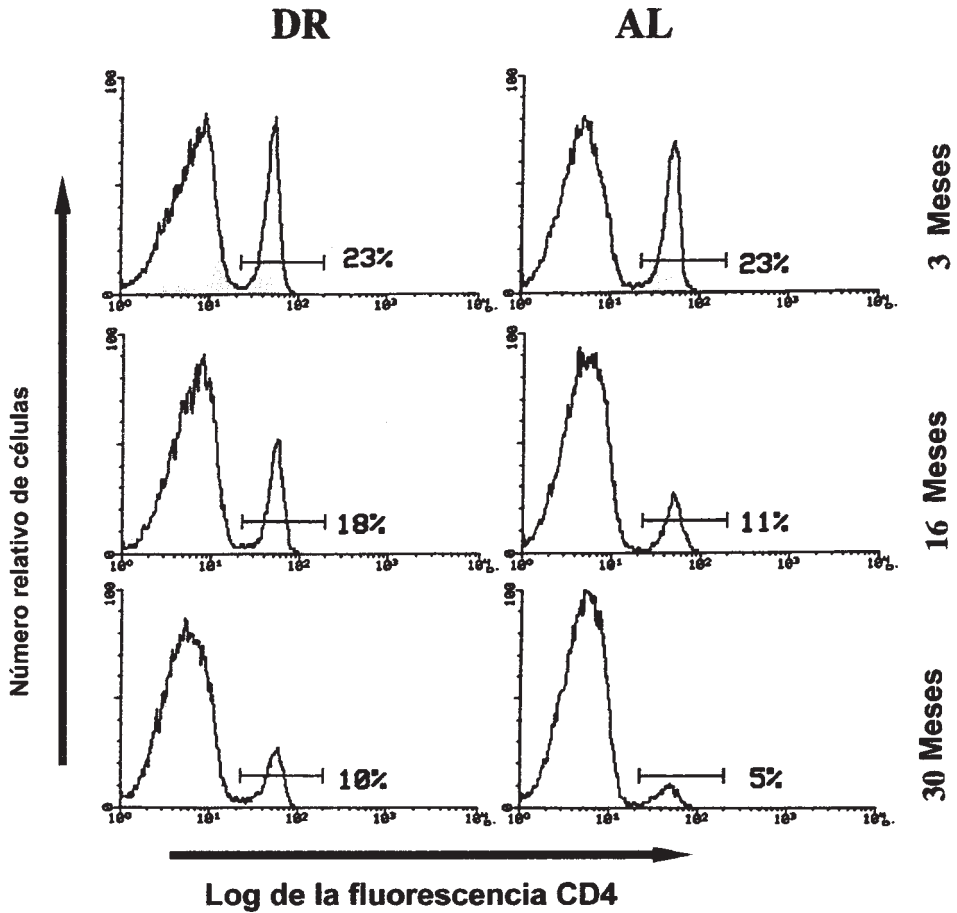


Figura 9. Retraso en el declinar dependiente de la edad en los linfocitos CD4T circulantes en ratones con dieta restringida. Leucocitos de sangre periférica se obtuvieron de ratones B6CBAT6 F1 de 3, 16 y 30 meses con dietas ad libitum (AL) y restringida (DR), se tiñeron con anticuerpo anti-ratón CD4 conjugado con FITC y se analizaron por citometría de flujo. (Chen et al, 1998).

comprobados experimentalmente. Dadas las consecuencias de la osteoporosis en la salud pública, la atención primaria deberá dirigirse, no solo a educar al segmento de la población senescente en plena expansión en la sociedad actual, sino también a promocionar la profilaxis en todos los pacientes con pérdida de calcio en su trama ósea o con tendencia a tal efecto por causas múltiples, entre las que principalmente figura el enve-



jecimiento. La osteoporosis se eleva considerablemente, especialmente en mujeres, a partir de los cincuenta años. Ha sido denominada la «plaga silenciosa de nuestra época» (Cascales, 1998).

El gen de la enzima telomerasa que demostró en el año 1998 conferir propiedades inmortales, a células humanas cultivadas en el laboratorio, ha sido desactivado en animales para dilucidar sus efectos. Los experimentos confirman la participación de este gen en el envejecimiento, pero ofrece sorpresas que matizan su posible uso terapéutico en humanos. Los experimentos más recientes han despertado numerosas expectativas sobre la utilización de la enzima telomerasa para tratar enfermedades asociadas al envejecimiento. Desde hacía tiempo se conocía que la telomerasa protege las terminaciones (telómeros) de los cromosomas de ser erosionados con cada división celular. Si este enzima pierde capacidad, la célula envejece y muere. Actualmente diversos laboratorios tratan de diseñar fármacos que activen la telomerasa en terapias ligadas al envejecimiento. La importancia de estas investigaciones radica en que son las primeras terapias en las que se observan los efectos de la carencia de esta enzima en animales manipulados a medida que envejecen en el laboratorio (Cascales, 1998 b).

En el Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, la Doctora Blasco ha obtenido ratones que carecen de telomerasa y ha logrado seis generaciones de animales con telómeros cada vez más cortos. De esta forma ha confirmado una vez más el papel de la telomerasa en el envejecimiento. El 60% de los animales mostraban signos externos evidentes de envejecimiento, como cierto tipo de heridas cutáneas así como una aparición prematura de canicie y pérdida del pelo. Estos efectos, incluso en los ratones con telómeros más cortos, tardaban en aparecer en presencia de telomerasa (Blasco *et al.*, 1999).

En la Figura 10 se reproduce un cuadro de Weindruch y Sohal (1997), donde se recogen los daños oxidativos que se acumulan en el transcurso del envejecimiento.

Los organismos multicelulares exhiben un declinar progresivo e irreversible de las funciones fisiológicas, que es característico del estado senescente. Aunque las bases moleculares de este declinar no se conocen aún en su totalidad, los mecanismos hasta ahora propuestos incluyen

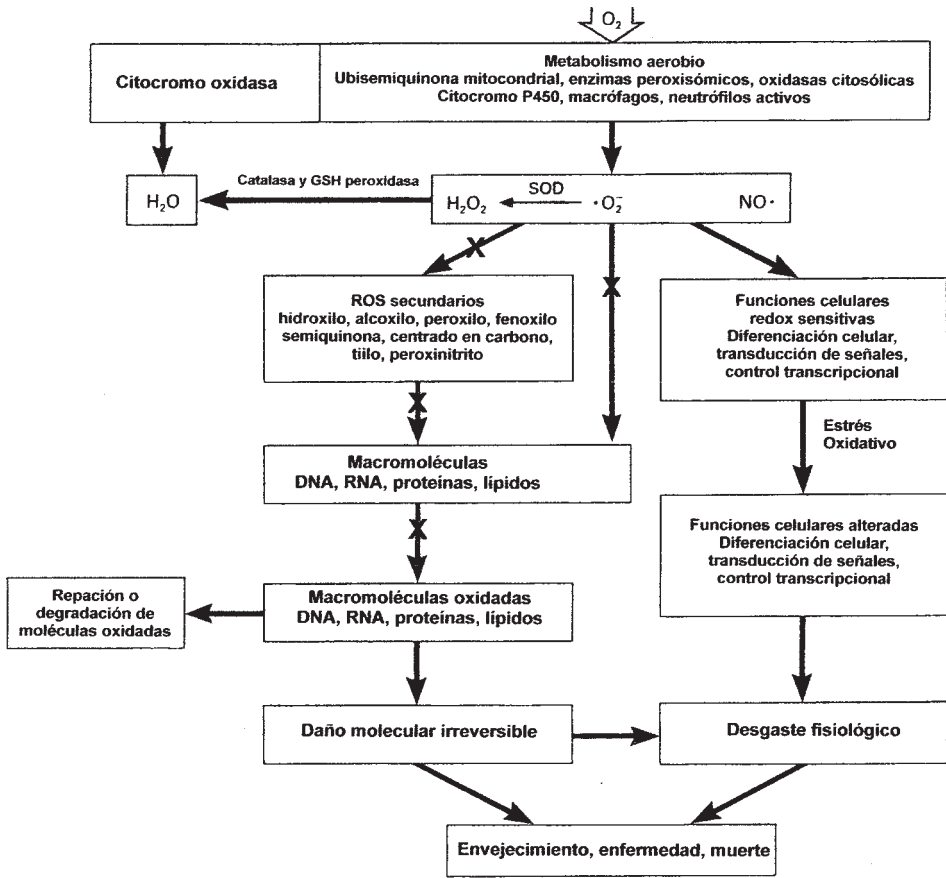


Figura 10. Daño oxidativo que se acumula a medida que transcurre la edad. Las ROS (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico) se generan en el interior de la célula y bien son inactivadas por las defensas antioxidantes o dan lugar a una serie de secundarias ROS. Estas ROS causan modificaciones oxidativas en las macromoléculas, algunas de las cuales pueden ser reparadas. La acumulación de lesiones oxidativas irreversibles, debidas al envejecimiento puede ser un factor causal de ciertas enfermedades degenerativas típicas de la edad. Las ROS se encuentran también relacionadas con la diferenciación y transducción de señales. X indica los lugares en los sistemas antioxidantes no enzimáticos (glutacion reducido, vitaminas E y C y urato) actuarían para evitar la lesión oxidativa. (Weindruch y Sohal, 1997).

un incremento en la generación de ROS y una progresiva acumulación de lesiones en el DNA que van a dar lugar a inestabilidad genética y a

alteraciones epigenéticas. Todo ello lleva consigo el deterioro oxidativo de macromoléculas críticas, la glicación de proteínas constitutivas y el acortamiento de los telómeros de células replicativas.

La importancia de la nutrición en el proceso del envejecimiento está bien reconocida. La restricción calórica de la ingesta hace disminuir el estrés oxidativo, la oxidación de las macromoléculas e incrementa la expectativa de vida.

La senectud se caracteriza por un incremento exponencial de proteínas alteradas por oxidación, lo cual conlleva la activación transcripcional de genes de respuesta al estrés, que procesan la eliminación de proteínas lesionadas o mal plegadas. Se ha observado que las dietas restringidas en calorías previenen esta inducción, lo cual ha hecho pensar que la modificación proteica por oxidación o glicación juega un papel decisivo en el envejecimiento. Las dietas hipocalóricas actúan disminuyendo la velocidad metabólica y como consecuencia la producción de subproductos tóxicos del metabolismo. La disminución de la transcripción de genes inducibles de respuesta al estrés, implicados en la detoxificación, reparación del DNA y de la respuesta al estrés oxidativo, inducida por la restricción calórica, se debe a la menor disponibilidad de los sustratos para estos sistemas. Los perfiles transcripcionales encontrados en animales alimentados con dietas bajas en calorías sin deficiencias en nutrientes esenciales, muestran una desviación dirigida hacia un mayor recambio proteico y a una menor lesión macromolecular. Este cambio puede detectarse a nivel hormonal, por ejemplo, sobre las vías señaladoras de la insulina mediante el incremento de la expresión de los genes que median la sensibilidad a esta hormona.

Quedan muchos puntos aún oscuros en el estudio de los factores que conducen a la plétora de cambios asociados con la senescencia, y en por qué estos cambios pueden ser retrasados mediante un menor contenido calórico de la ingesta. La restricción dietética moderada o dieta hipometabólica es hasta la fecha uno de los métodos más efectivos para elevar la expectativa de vida y para prevenir o retrasar las enfermedades relativas a la edad. La restricción dietética modula muchos procesos fisiológicos fundamentales, generación de ROS, reparación del DNA, metabolismo de fármacos, función inmune, regulación hormonal, etc.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) AGARWAL, S. y SOHAL, R.S. (1994): DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 12332-12335.
- (2) AGARWAL, S. y SOHAL, R.S. (1996): Relationship between susceptibility to protein oxidation, aging, and maximum life span potential of different species. *Exp. Gerontol.* 31, 365-372.
- (3) AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K. y HAGEN, T.M. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7915-7922.
- (4) AUTORES VARIOS (1997): *Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo*. Monografía (Coordinadora María Cascales). Ed. Fundación Casares Gil. Real Academia de Farmacia. Madrid.
- (5) BARJA, G.; CADENAS, S.; ROJAS, C.; PÉREZ-CAMPO, R. y LÓPEZ-TORRES, M. (1994): Low mitochondrial free radical production per unit O<sub>2</sub> consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Rad. Res.* 21, 317-327.
- (6) BARKER, D.J.P. (1994): *Mothers, Babies and Diseases in Later Life*. Ed. BMJ Publishing Group. Londres.
- (7) BARZILAI, N.; BANERJEE, S.; HAWKINS, M.; CHEN, W. y ROSETTI L. (1998): Caloric Restriction Reverses Hepatic Insulin Resistance in Aging Rats by Decreasing Visceral Fat. *J. Clin. Invest.* 101, 1353-1361.
- (8) BECKMAN, K.B. y AMES, B.N. (1998): The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547-581.
- (9) BERTRAND, H.A.; LYND, F.T.; MASORO, E.J. y YU, B.P. (1980): Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life prolonging restricted diet. *J. Gerontol.* 35, 827-835.
- (10) BLASCO, M.A.; GASSER, S.M. y LINGNER, J. (1999): Telomeres and Telomerase. *Deves Dev.* 13: 2353-2359.
- (11) CARTEE, G.D. y DEAN, D.J. (1994): Glucose transport with brief dietary on survival of mice. *Am. J. Physiol.* E946-E952.
- (12) CASCALES ANGOSTO, M. (1998): Osteoporosis, calcio y envejecimiento. En: *El problema del envejecimiento*. Ed. Barja G, Edit. Akal, pp 130-158. Madrid.
- (13) CASCALES ANGOSTO, M. (1998): Telomeros, Telomerasa, Senescencia y Cáncer. *Anales Real Academia Doctores*, Vol 3, 83-101.
- (14) CASCALES ANGOSTO, M. y SANTOS RUIZ, A. (1999): Estrés oxidativo, intoxicación y enfermedad. *Curso del Instituto de España (Tercer ciclo)*. Real Academia de Farmacia. Madrid.
- (15) CHANCE, B.; SIES, H. y BOVERIS, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605.
- (16) CHEN, J.; ASTLE, C.M. y HARRISON, D.E. (1998): Delayed Immune Aging in Diet-Restricted B6CBAT6 F1 Mice Is Associated With Preservation of Naive T Cells. *J. Gerontol. Biol. Sciences.* 53 A (5), B330-B337.

- (17) CHEN, J. y YU, B.P. (1994): Alterations in mitochondrial membranes fluidity by lipid peroxidation products. *Free Rad. Biol. Med.* 17, 411-417.
- (18) DAVIES, K.J.A. (1995): Oxidative stress: the paradox of aerobiosis. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1-31.
- (19) DUFFY, P.H.; FEUERS, R.; NAKAMURA, K.D.; LEAKEY, J. y HART, R.W. (1990): Effect of chronic caloric restriction on the synchronization of various physiological measures in old female Fischer 344 rats. *Chronobiol. Int.* 7, 113-124.
- (20) FRIDOVICH, I. (1978): The biology of oxygen radicals. *Science.* 201, 875-880.
- (21) GODFREY, K.; ROBINSON, I.; BARKER, D.J.P.; OSMOND, C. y COX, V. (1996): Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *BMJ.* 312, 410-414.
- (22) GOMI, F. y MATSUO, M. (1998): Effect of aging and food restriction on the antioxidant enzyme activity of rat livers. *J. Gerontol.* 53A, B161-B167.
- (23) GRANDE COVIÁN, F. y VARELA MOSQUERA, G. (1993): Aspectos de la nutrición humana. Pub. Fundación BBV. Bilbao, 1993.
- (24) HALL, D.M.; OBERLEY, T.D.; MOSELEY, P.M.; BUETTNER, G.R.; OBERLEY, L.W.; WEINDRUCH, R. y KREGEL, K.C. (2000): Caloric restriction improves thermotolerance and reduces hyperthermia-induced cellular damage in old rats. *FASEB J.* 14: 78-86.
- (25) HALLIWELL, B. y GUTTERIDGE, J.M. (1990): Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1-85.
- (26) HARMAN, D. (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300.
- (27) HART, R.W.; NEUMAN, D.A. y ROBINSON, R.T. (eds.) (1995): Dietary Restriction: Implications for the Design and Interpretation of Toxicity and Carcinogenicity Studies. ILSI Press, Washington, DC.
- (28) HART, R.W. y TURTURRO, A. (1998): Evolution and dietary restriction. *Exp Gerontol.* 33, 53-60.
- (29) HARTWEL, R.M. y otros autores (1997): El capitalismo y los historiadores. Unión Editorial.
- (30) HEYDARI, A.R.; YOU, S.; TAKAHASHI, R.; GUTMANN, M.; SARGE, K.D. y RICHARDSON, A. (1996): Effect of Caloric Restriction on the Expression of Heat Shock Protein 70 and the Activation of Heat Shock Transcription Factor 1. *Develop Genetics.* 18, 114-124.
- (31) INGRAM, D.K.; CUTLER, R.G.; WEINDRUCH R. *et al.* (1990): Dietary restriction and aging: the initiation of the primate study. *J. Gerontol. Biol. Sci.* 45, B148-B163.
- (32) JANSSEN, Y.M.; VAN HOUTEN, B.; BORM, P.J. y MOSSMAN, B.T. (1993): Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Invest.* 69, 261-274.
- (33) KEMNITZ, J.W.; WEINDRUCH, R.; ROECKER, E.B.; CRAWFORD, K.; KAUFMAN, P.L. y ERSHLER, W.B. (1993): Dietary restriction of adult male rhesus monkey: design, methodology and preliminary findings from the first year of study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 48, B17-B26.

- (34) KEMNITZ, J.W.; ROECKER, E.B.; WEINDRUCH, R.; ELSON, D.F.; BAUM, S.T. y BERGMAN, R.N. (1994): Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. *Am. J. Physiol.* 266, E540-E547.
- (35) KOIZUMI, A.; TSUKADA, M.; WADA, Y.; MASUDA, H. y WEINDRUCH, R. (1992): Mitotic activity in mice is suppressed by energy restriction-induced torpor. *J. Nutr.* 122, 1446-1453.
- (36) KU, H.H. y SOHAL, R.S. (1993): Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. *Mech. Ageing. Dev.* 72, 67-76.
- (37) KU, H.H.; BRUNK, U.T. y SOHAL, R.S. (1993): Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad. Biol. Med.* 15, 621-627.
- (38) LANE, M.A.; BAER, D.J.; RUMPLER, W.V. *et al.* (1996): Caloric restriction lowers body temperature in rhesus monkey, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 4159-4164.
- (39) LANGLEY, M. y JACKSON, A.A. (1994): The acute phase response of adult rats is altered by in utero exposure to maternal low protein diets. *Clin. Soc.* 86, 217-222.
- (40) LAKOWSKI, B. y HAKIMI, S. (1996): Determination of life-span in *Caenorabditis elegans* by four clock genes. *Science.* 272, 1010-1013.
- (41) LAKOWSKI, B. y HAKIMI, S. (1998): The genetics of caloric restriction in *Caenorabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95; 13091-13096.
- (42) LEE, C.K.; KLOPP, R.G.; WEINDRUCH, R. y PROLLA, T. (1999) Gene expresión profile of aging and its retardation by caloric restriction *Scienc* 285: 1390-1393.
- (43) LEONARD, W.R. y OBERTSON, M.L. (1997): Comparative primate energetics and hominid evolution. *Am. J. Phys. Anthropol.* 102, 265-281.
- (44) LIPMAN, R.D.; SMITH, D.E.; BLUMBERG, J.B. y BRONSON, RT. (1998): Effects of caloric restriction or augmentation in adult rats: Longevity and lesion biomarkers of aging. *Ageing Clin. Exp. Res.* 10, 463-470.
- (45) LÓPEZ-TORRES, M.; PÉREZ-CAMPO, R.; ROJAS, C.; CADENAS, S. y BARJA, G. (1993): Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and basal and maximum aerobic capacity. *Mech Ageing Dev.* 70, 177-199.
- (46) LYMAN, C.P.; O'BRIEN, R.C.; GREENE, G.C. y PAPAFRANGOS, E.D. (1981): Hibernation and longevity in the Turkish hamster *Mesocricetus brandti*. *Science.* 212, 668-670.
- (47) MCCAY, C.M. y CROWELL, M.F. (1934): Prolonging the life span. *Sci. Month* 39: 405-414.
- (48) MASORO, E.J. (1998): Influence of caloric intake on aging and the response to stress. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Reo.* 1, 243-257.

- (49) MASORO E.J.; SHIMOKAWA, I. y YU, B.P. (1991): Retardation of the aging processes in rats by food restriction. *Ann. NY Acad. Sci.* 621, 337-352.
- (50) MASORO, E.J.; YU, B.P. y BERTRAND, H.A. (1982): Action of food restriction in delaying the aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 4239.
- (51) MATSUO, M.; GOMI, F. y DOOLEY, M.M. (1992): Age related alterations in antioxidant capacity and lipid peroxidation in brain, liver and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rats. *Mech. Ageing Dev.* 64, 273-292.
- (52) MATSUO, M.; GOMI, F.; KURAMOTO, K. y SAGAI, M. (1993): Food restriction suppresses and age-dependent increase in the exhalation of pentane from rats: a longitudinal study. *J. Gerontol.* 48, B133-B138.
- (53) MAYHEW, M.; RENGANATHAN, M. y DELBONO, O. (1998): Effectiveness of Caloric Restriction in Preventing Age-Related Changes in Rat Skeletal Muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 95-99.
- (54) MERRY, B.J. y HOLEHAN, A.M. (1996): Retardation by restricted feeding of age-related changes in steroidogenic activity of rat pre and post-ovulatory follicles. *Age Aging.* 25, 250-255.
- (55) McCord, J.M. (1995): Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209, 112-117.
- (56) NEUMAN, D.A. y ROBINSON, R.T. (1995): *Dietary Restrictions implications for the Design and interpretation of Toxicity and Carcinogenicity Studies.* ILS Press. Washington.
- (57) NOVELLI, M.; MASIELLO, P.; BOMBARA, M. y BERGAMINI, E. (1998): Protein Glycation in the Aging Male Sprague-Drawley Rat: Effects of Antiaging Diet Restrictions. *J. Gerontol. Biol. Sciences.* 53 A (2), B94-B101.
- (58) ORR, W.C. y SOHAL, R.S. (1994): Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science.* 263, 1128-1130.
- (59) OSBORNE, T.B.; MENDEL, L.B. y FERRY, E.L. (1917): *J. Nutr.* 45: 294-295.
- (60) OSBORNE, T.B.; MENDEL, L.B. y FERRY, E.L. (1917): The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life of rats. *Science* 45: 294-295.
- (61) PEARL, R. (1928): *The Rate of Living: being an account of some experimental studies on the biology of life duration.* New York: A.A. Knopf.
- (62) PELLERIN, D. (1998): *Presentation et analyse du rapport du Comité Consultatif National d'Etique sur le vieillissement.* 59 (2), 5 mayo.
- (63) PRYOR, W.A. (1978): The formation of free radicals and the consequences of their reactions in vivo. *Photochem. Photobiol.* 28, 787.
- (64) Ramaiah, S.K.; Soni, M.G.; Bucci, T.J. y Mehendale, H.M. (1998): Diet Restriction Enhances Compensatory Liver Tissue Repair and Survival Following Administration of Lethal Dose of Thioacetamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 150, 12-21.
- (65) RICHTER, C. (1995): Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relation to aging. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27; 647-653.

- (66) RIKANS, L.E. y HORN BROOK, K.R. (1997): Lipid peroxidation antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1362, 116-127.
- (67) RUBNER, M. (1908): Das Problem der Lebensdauer und Seine Beziehungen zu Wachstum und Ernährung. Munich: Oldenbourg.
- (68) RUSSELL, B. (1951): The impact of science on society. Editorial Columbia. University Press.
- (69) SACHER, G.A. (1997): Life table modification and life prolongation. In Finch CE, Hayflick L (eds.): «Handbook of the Biology of Aging». New York: Van Nostrand-Reinhold, pp. 582-638.
- (70) SANTOS-RUIZ, A. y CASCALES, M. (1997): Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo. Curso del Instituto de España (Tercer ciclo). Madrid.
- (71) SANZ, N.; DíEZ-FERNÁNDEZ, C.; ÁLVAREZ, A. y CASCALES, M. (1997): Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. *J. Hepatol.* 27, 525-534.
- (72) SANZ, N.; DíEZ-FERNÁNDEZ, C. y CASCALES, M. (1998): Aging delays the post-necrotic restoration of liver function. *Bio-Factors* 8, 103-109.
- (73) SANZ, N.; DíEZ-FERNÁNDEZ, C.; ÁLVAREZ, A.M.; FERNÁNDEZ-SIMÓN, L. y CASCALES, M. (1999): Age-Related Changes on Parameters of Experimentally-Induced Liver Injury and Regeneration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 40-49.
- (74) SEGOVIA ARANA, J.M. (1998): Biosociología del envejecimiento. Discurso de ingreso en la Real Academia de Ciencias Morales y Políticas. Madrid, 27 de octubre.
- (75) SOHAL, R.S.; AGARWAL, S.; CANDAS, M.; FORSTER, M.J. y LAL, H. (1994): Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech. Ageing Dev.* 76, 215-224.
- (76) SOHAL, R.S.; KU, H.H. y AGARWAL, S. (1993): Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 7-11.
- (77) SOHAL, R.S.; KU, H.H.; AGARWAL, S.; FORSTER, M.J. y LAL, H. (1994): Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* 74, 121-133.
- (78) SOHAL, R.S.; SOHAL, B.H. y ORR, W.C. (1995): Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. *Free Rad. Biol. Med.* 19, 499-504.
- (79) SOHAL, R.S. y WEINDRUCH, R. (1996): Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 273, 59-63.
- (80) STADTMAN, E.R. (1995): Protein oxidation and aging. *Science.* 257, 1220-1224.
- (81) TIAN, L.; CAI, Q.; BOWEN, R. y WEI, H. (1995): Effects of caloric restriction on age-related oxidative modifications of macromolecules and lymphocyte proliferation in rats. *Free Rad. Biol. Med.* 19 (6), 859-865.
- (82) TURRENS, J.F. y MCCORD, J.M. (1990): Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids, AC Paulet, L Douste-Blazu, R Paoletti, eds., Plenum, New York, 203-212.



- (83) VARELA MOSQUERA, G. (1993): Dieta equilibrada en las personas de edad avanzada (Conferencia en el curso «Problemas nutricionales en las personas de edad avanzada». Universidad Menéndez Pelayo. Valencia. 21-25 de junio.
- (84) WARNER, H.R. (1994): Superoxide dismutase, aging and degenerative disease. *Free Rad. Biol. Med.* 17, 249-258.
- (85) WEINDRUCH, R. y SOHAL, R.S. (1997): Caloric Intake and Aging. *New England J. Med.* 337, 986-994.
- (86) WEINDRUCH, R. y WALFORD, R.L. (1982): Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science.* 215, 1415-1418.
- (87) WEINDRUCH, R. y WALFORD, R.L. (1988): The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction. Springfield, IL: Chartles C Thomas.
- (88) WEINDRUCH, R.; WALFORD, R.L.; FLIGIEL, S. y GUTHRIE, D. (1986): The retardation of aging in mice by dietary restriction: Longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J. Nutr.* 116, 641-654.
- (89) YOUNGMAN, L.D.; PARK, J.Y.K. y AMES, B.N. (1992): Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of proteins as calories. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 9112-9116.
- (90) YU, B.P. (1995): Modulation of oxidative stress as a means of life-prolonging action of dietary restriction. In: Cutler RG; Packer L; Bertram J; Mori A, eds, *Oxidative stress and aging. Bales: Birkhäuser Verlag;* pp 331-342.
- (91) YU, B.P. (1996): Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Rad. Biol. Med.* 21 (5), 651-658.