

Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares

M.A. Peinado, M.L. del Moral, F.J. Esteban, E. Martínez-Lara,
E. Siles, A. Jiménez, R. Hernández-Cobo, S. Blanco, J. Rodrigo, J.A. Pedrosa

AGING AND NEURODEGENERATION: MOLECULAR AND CELLULAR BASES

Summary. Objective. A review about the possible cellular and molecular mechanisms of aging and related neurodegenerative diseases. Development. The mechanisms involved in neuronal decrease, connectivity losses and glial reactivity, detected both in neurodegenerative (Alzheimer's disease) and physiological aging, are analyzed from the morphological and histological point of view to provide the morphofunctional base of the cognitive and intellectual alterations characterizing the senescence process. Taken together, these data are correlated to the possible genetical aspects implied in this process, reviewing the most relevant results on senescence and cellular death obtained from yeast, fruit fly and nematodes; besides this, a brief review of the molecular biology of gerontogenes was carried out, and the possible mechanisms inducing aging and neurodegenerative processes are analyzed according to the state-of-the-art related theories. Finally, cellular, biochemical and genetical data are correlated in the signal transduction way implied in the increase of the intracellular calcium level as the starting point of cell death. Conclusions. The main process implied in the neuronal cell death responsible for aging and the related neurodegenerative diseases are started by different agents such as the lacking of neurotrophic factors, hypoxia, hypoglycemia, excitotoxicity, and oxygen and nitrogen free radicals. [REV NEUROL 2000; 31: 1054-65] [<http://www.revneurolog.com/3111/j111054.pdf>]

Key words. Cerebral aging. Excitotoxicity. Gerontogenes. Neurodegenerative diseases. Nitric oxide. Oxygen free radicals.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso irreversible que afecta de forma heterogénea a las células que conforman los seres vivos, las cuales, con el paso del tiempo, se ven sometidas a un deterioro morfofuncional que puede conducir las a la muerte [1,2]. Se sabe que las claves que sostienen este proceso involutivo son tanto de carácter genético como ambiental [3-5]. Según apunta una de las teorías más reconocidas sobre el envejecimiento [6], los seres vivos han sido diseñados para reproducirse y posteriormente extinguirse, puesto que la evolución ha optado por favorecer la reproducción frente a la inmortalidad. De esta forma, una vez traspasado el umbral que deja atrás el período fértil de la vida, los seres vivos, y como tal el hombre, inician un declive progresivo de todas sus funciones y capacidades con el consiguiente deterioro físico e intelectual.

El hecho de que, incluso dentro de la misma especie, no todos los individuos envejezcan por igual, pone de manifiesto la existencia de condicionamientos de carácter genético, indudablemente con un fuerte componente ambiental, que marcan las pautas del proceso de senescencia [7]. En este sentido, seguramente no sería difícil evocar la imagen de algún nonagenario que conserve un nivel adecuado de actividad física y mental, aunque no suele ser lo más común. Esto es debido a que la expectativa de vida en los humanos no cruza más allá de la séptima década y, además, a que son muchas las personas de edad que desafortunadamente sufren, en mayor o menor medida, un deterioro de sus capacidades físicas e intelectuales, sobre todo cuando el envejecimiento se acompaña de enfermedades neurodegenerativas como las demencias vasculares, la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer, cuya incidencia aumenta exponencialmente en función de la edad [8].

tunadamente sufren, en mayor o menor medida, un deterioro de sus capacidades físicas e intelectuales, sobre todo cuando el envejecimiento se acompaña de enfermedades neurodegenerativas como las demencias vasculares, la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer, cuya incidencia aumenta exponencialmente en función de la edad [8].

ENVEJECIMIENTO PATOLÓGICO Y FISIOLÓGICO: CAMBIOS NEURONALES Y REACTIVIDAD GLIAL

Durante el envejecimiento fisiológico, pero sobre todo en los casos de enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer, tienen lugar una serie de alteraciones fisiológicas que son susceptibles de ser observadas *in vivo* mediante la cámara de positrones [9], o detectadas mediante técnicas radiológicas avanzadas como es el caso de la resonancia magnética nuclear [10]. Estas deficiencias de la actividad cerebral son la consecuencia de determinados cambios estructurales que, en los enfermos de Alzheimer, implican disminución en el volumen cerebral, el ensanchamiento de ventrículos, el aumento de líquido cefalorraquídeo y la disminución de sustancia blanca [11]. Cuando se hace un examen microscópico del cerebro de estos enfermos, se aprecian una serie de cambios degenerativos que afectan a multitud de neuronas integradas en los circuitos nerviosos responsables del mantenimiento de las actividades cerebrales cognitivas; de hecho, muchas neuronas mueren, sobre todo en zonas como la corteza cerebral y el hipocampo, generándose una serie de lesiones características de esta enfermedad denominadas marañas neurofibrilares y placas seniles [12].

Los cambios anatómicos y microscópicos que tienen lugar durante el envejecimiento fisiológico reproducen a pequeña escala los descritos para los enfermos de Alzheimer [11]; sin embargo, sólo en los muy ancianos se han podido detectar algunas lesiones como las placas seniles y las marañas neurofibrilares [13]. También se ha observado una cierta pérdida neuronal en zonas muy localizadas como la sustancia negra, el

Recibido: 23.06.00. Aceptado tras revisión externa sin modificaciones: 17.07.00.

Unidad Asociada CSIC-Universidad de Jaén. Áreas de Biología Celular y Bioquímica y Biología Molecular. Departamento de Neuroanatomía Comparada. Madrid, España.

Correspondencia: Dra. María Ángeles Peinado. Departamento de Biología Experimental (Biología Celular). Universidad de Jaén. Las Lagunillas, s/n. E-23071 Jaén. Fax: +34953 212 141. E-mail: apeinado@ujaen.es

Agradecimientos. Subvencionado por la Secretaría de Estado de Universidades, Investigación y Desarrollo Tecnológico: PM-98-0126-CO2-O2

© 2000, REVISTA DE NEUROLOGÍA

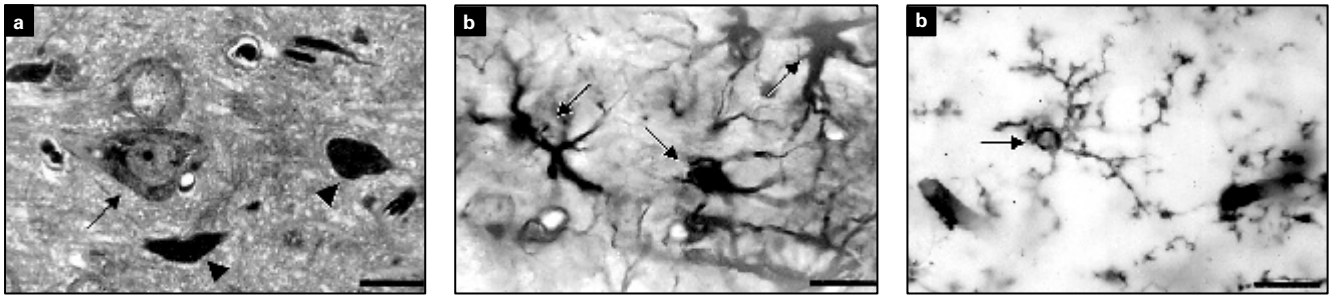


Figura 1. Corteza cerebral de rata de 32 meses. a) Corte semifino teñido con azul de toluidina en el que se aprecian neuronas oscuras (puntas de flecha) y otras que contienen gránulos de lipofuscina (flecha). b) Criocorte inmunoteñido para GFAP mostrando astrocitos GFAP-inmunoreactivos (flechas). c) Criocorte en el que se observan células microgliales teñidas con lectina de tomate (flechas). (Barras en a, b y c: 10 μ m).

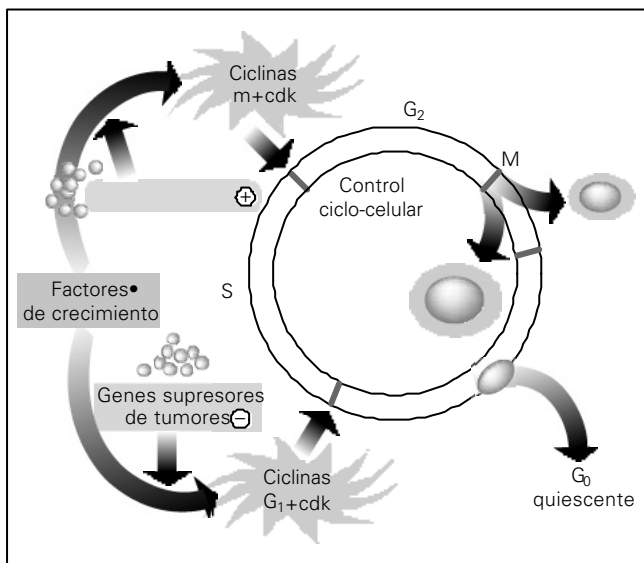


Figura 2. Representación esquemática del ciclo celular.

locus coeruleus y el hipocampo [14-16], aunque en la mayoría de las regiones cerebrales la densidad neuronal y el número total de neuronas permanece estable; tal es el caso de la corteza cerebral, donde diferentes estudios cuantitativos, llevados a cabo tanto en humanos como en primates que han tenido un envejecimiento normal, han confirmado este extremo [17, 18]. En este sentido, trabajos realizados por nuestro grupo de investigación en la corteza frontal y parietal de la rata han indicado estabilidad para la población neuronal incluso en individuos muy viejos (32-36 meses) [19,20]. No obstante, detectamos cambios en las neuronas tales como la típica acumulación de lipofuscina y cierta retracción de su núcleo y soma [19,20]. Además, hemos observado algunas neuronas fuertemente retraídas e intensamente basófilas [21] (Fig. 1 a). Estas neuronas, que han sido ampliamente descritas en numerosas patologías, presentan también una fuerte argirofilia y osmiofilia y, debido a su elevada afinidad tintorial, se las conoce como neuronas oscuras o picnóticas [22,23]. Se ha postulado que las neuronas oscuras podrían originarse como consecuencia de una transformación de la energía mecánica que almacenan los neurofilamentos del citoesqueleto gracias a su conformación helicoidal [24]; en situación normal, esta energía es de tipo metaestable, pero tras cualquier daño, pasa a ser un tipo de energía inestable que se transmite por todo el citoesqueleto y provoca la apari-

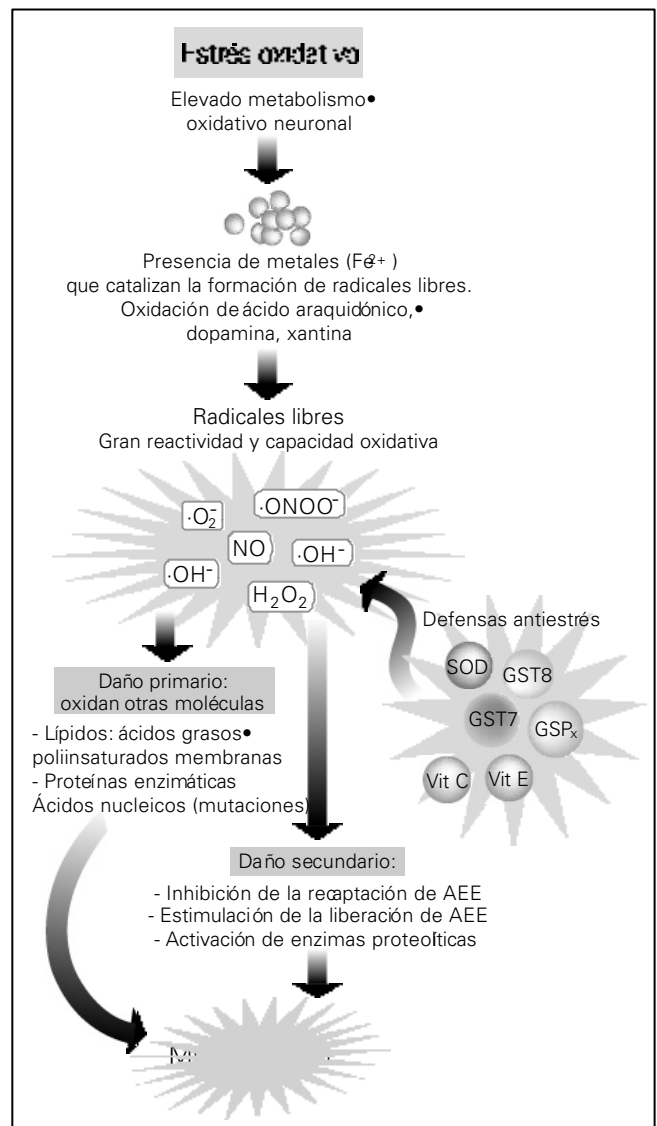


Figura 3. Esquema ilustrativo de la teoría de los radicales libres.

ción de puentes cruzados entre las diferentes proteínas fibrilares que lo conforman. Esta precipitación citoesquelética retrae a la célula provocando deformación de la membrana plasmática y demás membranas celulares. La retracción sólo afecta a neuronas aisladas, y aparentemente no se propaga a las células

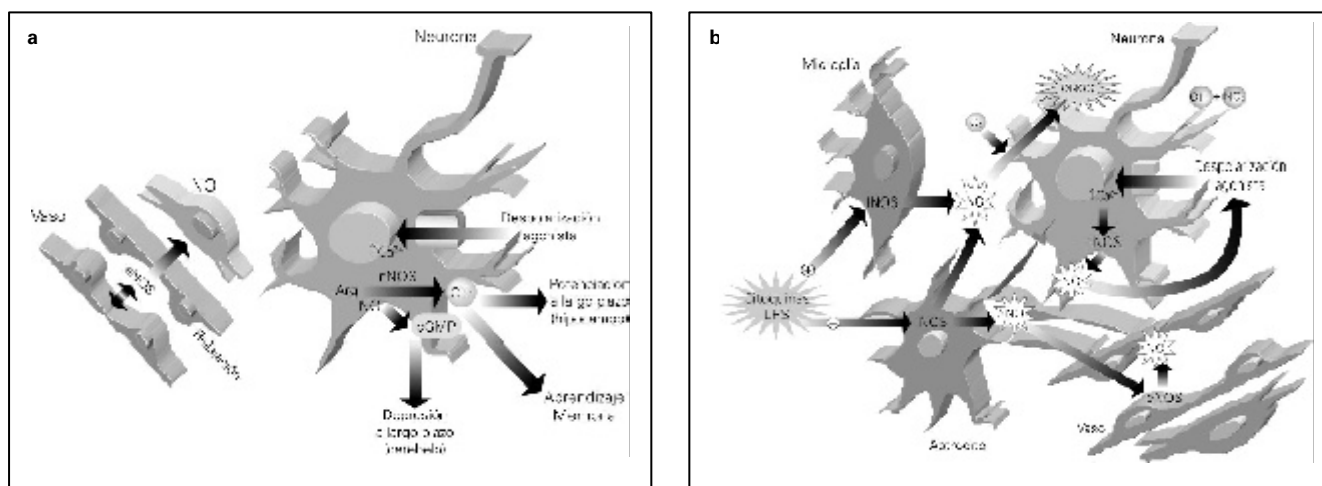


Figura 4. Representación esquemática de las implicaciones fisiológicas y patológicas del óxido nítrico.

del entorno. El hecho de que estas neuronas aumenten considerablemente en los procesos de desarrollo [23], así como en diferentes patologías como la isquemia focal [22] o las lesiones traumáticas [25], hace suponer que, como se tratará posteriormente, forman parte de estadios intermedios en el proceso neurodegenerativo que conduce a la muerte neuronal. Estudios realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto, mediante técnicas cuantitativas, que esta población neuronal aumenta no sólo tras lesiones traumáticas sino también, aunque en menor escala, durante el envejecimiento [21,26,27].

Diferentes autores han descrito que el envejecimiento implica pérdida de conectividad nerviosa [28,29]. No obstante, existen evidencias experimentales que apuntan hacia una cierta capacidad regenerativa del tejido nervioso [30]; así, cuando alguna neurona se pierde, las situadas en la vecindad se activan, sufren un proceso de hipertrofia por el que aumenta su árbol dendrítico, y finalmente restauran la conectividad perdida. Sin embargo, esta capacidad está disminuida en los muy ancianos y en los enfermos de Alzheimer [31].

Junto a las neuronas existen otras poblaciones celulares que, en conjunto, se denominan gliales, y que desempeñan papeles de gran importancia en el funcionamiento del cerebro. Las células de la glía se encuadran en varios tipos, entre los que se cuentan astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales; además, existe otra población celular, los pericitos, de suma importancia para la función cerebral.

Particular interés, en el proceso del envejecimiento, tienen asignados los astrocitos, que corresponden a células estrelladas que forman una red distribuida entre vasos sanguíneos y neuronas, y que desarrollan fundamentalmente funciones tróficas (Fig. 2b). Suministran glucosa a las neuronas junto a una gran cantidad de factores de crecimiento que son responsables de su supervivencia [32,33]. Además, tienen asignadas otras misiones de suma importancia como es la de retirar el exceso de determinados neurotransmisores, como los aminoácidos excitatorios, que de permanecer en el espacio extracelular tendrían un efecto tóxico sobre las neuronas [34,35] (ver más adelante). Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la extraordinaria reactividad de estas células en procesos de lesión y, cómo no, aunque en menor escala, durante el envejecimiento [36]. De hecho, en animales viejos los astrocitos sufren

un proceso de hipertrofia e hiperplasia que ha sido descrito en ratas de la variedad Sprague-Dawley [37]; estudios inmunocitoquímicos y bioquímicos, efectuados en nuestro laboratorio mediante marcaje y detección cuantitativa de la proteína fibrilar ácida de glía (GFAP), han confirmado este extremo en ratas de la variedad Wistar (resultados no publicados). Así pues, es plausible que la reactividad astrogliar detectada en el envejecimiento pudiera ser, al menos en parte, responsable de la capacidad regenerativa de las neuronas.

Las células microgliales, que desarrollan funciones inmunes en el cerebro (Fig. 3c), también pueden sufrir un proceso de activación tras lesión o enfermedad [38,39]. Aunque esta activación está orientada inicialmente a contrarrestar el daño tisular, las células de microglía activa pueden excederse en sus funciones y acabar induciendo un proceso patológico [40,41]. Así, las microglías activadas no sólo cambian su morfología, sino que, además, comienzan a secretar factores de crecimiento y citocinas; aunque estas sustancias están programadas inicialmente para restaurar la homeostasis del tejido y desencadenar la respuesta inmune más adecuada, pueden llegar a activar cascadas metabólicas de muerte celular mediante distintos mecanismos, entre los que se encuentra la producción de radicales libres [42,43]. Los estudios realizados por nuestro grupo sobre esta población glial, que cuantificamos en corteza junto a oligodendrocitos, indicaron que, a diferencia de los astrocitos, estas células no presentan hipertrofia durante el envejecimiento fisiológico, aunque sí detectamos un aumento de las mismas en individuos con lesiones traumáticas [44]. El papel dual como agentes neuroprotectores y neurotóxicos de las células gliales permite entender la presencia de células de microglía y astrocitos junto a los depósitos de β -amiloide en las placas seniles de los enfermos de Alzheimer [45].

Los pericitos del cerebro, células de localización perivascular, también se hipertrofian durante el envejecimiento. Estudios ultraestructurales demuestran que las láminas basales de los capilares se hacen más gruesas y, entre éstas y el endotelio, donde se localizan los pericitos, se observan abundantes zonas de degeneración microvacuolar no presentes en individuos jóvenes [44]. Los pericitos forman parte de la barrera hematoencefálica y junto a astrocitos y microglía perivascular son responsables del mantenimiento de la homeostasis local [46] y

de la secreción de una amplia variedad de sustancias vasoactivas [47]. El papel que ejercen estas células en la hipertensión [48], así como su probada capacidad proliferativa bajo condiciones de hipoxia [49], apoyan su implicación en los mecanismos de envejecimiento.

BASES GENÉTICAS DEL ENVEJECIMIENTO

La clave para entender el proceso de envejecimiento es poder encontrar una respuesta adecuada que permita explicar cómo se desencadenan los cambios funcionales, macroscópicos y microscópicos descritos hasta el momento. En este sentido, diferentes estudios consideran que la senescencia es la consecuencia del cumplimiento de un programa genético que empieza a ejecutarse con el desarrollo (etapa prenatal y posnatal), que continúa en el adulto y que culmina, tras la etapa reproductiva, con la vejez [50-52]. De hecho, empiezan a conocerse toda una serie de genes, que han sido denominados genéricamente como gerontogenes, que guardan una estrecha relación con la esperanza de vida de una determinada especie [53-55]. La actividad de estos genes está modulada por numerosos estímulos tanto externos como internos, los cuales actúan desencadenando cascadas de señales que inducen o reprimen su expresión y que, por consiguiente, aceleran o ralentizan el desarrollo del programa genético que conduce hasta la senescencia. Algunos de estos genes están mutados en familias que padecen enfermedades degenerativas como la progeria—un tipo de envejecimiento prematuro— [56] o la enfermedad de Alzheimer; de hecho, los estudios genéticos de estas familias han aportado bastante luz sobre el tema [57,58]. Concretamente, en enfermos de Alzheimer se han identificado mutaciones en los genes de las presenilinas 1 y 2, proteínas de membrana implicadas en sistemas de transducción de señales [59,60]. También se ven afectados el gen de la ApoE, que actúa como una chaperona para la proteína amiloide [61], los de las proteínas α -2-macroglobulina y la proteína relacionada con el receptor de LDL, cuyos productos génicos se acumulan en las placas seniles [62], y cómo no, el propio gen responsable del precursor del β -amiloide (APP) [63]. En este grupo también se encuentra el gen de la proteína tau, cuya variante fosforilada se acumula en las marañas neurofibrilares que aparecen, como se ha mencionado anteriormente de forma característica en los enfermos de Alzheimer [64] y, de forma cuantitativamente menor, pero cualitativamente similar, durante el envejecimiento fisiológico [13]. Sin embargo, aunque todos estos productos génicos están implicados en cambios neurodegenerativos y de muerte neuronal, e indudablemente inciden sobre el proceso de senescencia, aún se desconocen en amplitud cuáles son sus mecanismos de actuación.

Por otro lado, existe otra serie de genes con una implicación más directa en los fenómenos de senescencia y muerte celular, y cuya función, así como la de los productos génicos que codifican, se conoce más ampliamente gracias a los estudios realizados en sistemas sencillos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [5], el nematodo *Caenorhabditis elegans* [51,65] y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* [7]. En todas estas especies se han seleccionado individuos mutantes que tienen duplicada e incluso triplicada su esperanza de vida. Concretamente en nematodos, caben destacar los denominados genéricamente como mutantes *clock*, que viven un 70% más que sus congéneres y que presentan ralentizados todos sus procesos vitales. Dentro de este grupo de mutantes longevos se han identi-

ficado mutaciones en los genes *clk-1*, *clk-2*, *clk-3* y *gro-1*, todos ellos implicados en mecanismos de regulación de la actividad metabólica. Así, el gen *clk-1* codifica la proteína mitocondrial Clk, que es homóloga a una proteína de levadura requerida para la síntesis del coenzima Q (ubiquinona) de la cadena respiratoria; su sobreexpresión eleva el nivel de fosforilación oxidativa y reduce la esperanza de vida [66]. Por otra parte, existen otra serie de mutantes como *lag 1* y *ras* en levaduras, y *daf-2*, *age-1*, *akt-1*, *akt-2*, *daf-16* y *daf-18* en nematodos, que resisten más eficazmente los daños producidos por el estrés oxidativo; los correspondientes genes mutados codifican proteínas implicadas en cascadas de señalización intracelular, que influyen sobre la expresión y nivel de actividad de determinadas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (GSP) [5,65,55]. No obstante, hasta la fecha se desconocen en detalle los mecanismos exactos por los que tiene lugar esta correlación inversa entre longevidad y niveles de metabolismo [67].

Para comenzar a elucidar las bases genéticas del envejecimiento han sido fundamentales los trabajos pioneros del grupo de Horvitz en *Caenorhabditis elegans*, que descifraron las claves de un tipo de muerte o suicidio celular, observada durante el desarrollo de este pequeño nematodo del suelo (de las 1.090 células que tiene la larva, 132 se suicidan durante el desarrollo) y que posteriormente se ha visto que operan en una gran cantidad de procesos fisiológicos de recambio celular propios del adulto. Este tipo de muerte, genéticamente programada, fue denominada apoptosis, para diferenciarla de otro tipo de muerte celular patológica denominada necrosis [68].

MUERTE PROGRAMADA O APOPTOSIS

La característica más sobresaliente de la apoptosis es que se trata de un mecanismo fisiológico de muerte celular que es necesario para mantener la plasticidad del organismo y eliminar las células inservibles o que se tornan peligrosas. La apoptosis no causa daño secundario ni inflamación. De hecho, la célula apoptótica se separa de las células vecinas y acaba fragmentándose en una serie de cuerpos apoptóticos que son eliminados por fagocitos del entorno [69,70]. La necrosis, por el contrario, es un mecanismo patológico consecuencia de un daño celular extremo, que afecta a las células colindantes y provoca inflamación [71].

Como se deriva de lo visto, la apoptosis es fundamental para mantener la integridad de los organismos pluricelulares y su ejecución evita enfermedades como el cáncer, o la autoinmunidad [72,73]. Evidentemente, el contrapunto lo ponen ciertas situaciones patológicas en las que se ha demostrado que la apoptosis supone una pérdida irreparable de células. En concreto, hoy se sabe que muchas de las neuronas que desaparecen en los enfermos de Alzheimer [74], Parkinson [75] y en los accidentes cerebrovasculares [76], lo hacen por apoptosis. No obstante, existen mecanismos de protección para evitar estas situaciones, de forma que las células que no se dividen como las neuronas, y las células musculares cardíacas son más resistentes a padecer apoptosis. Esta resistencia a la apoptosis está modulada por proteínas implicadas en sistemas de transducción de señales como Bcl-2, y otras como Bax y Bad, de las que se hablará posteriormente [43,77].

Finalmente, y a la luz de todo lo expuesto, se ha especulado con la posibilidad de que muchas de las neuronas oscuras, a las

que se hizo mención anteriormente, y que se detectan durante el desarrollo, el envejecimiento o en situaciones de daño celular, pudieran corresponder a estadios iniciales en el proceso de muerte apoptótica, aunque desconocemos todavía por cuánto tiempo permanecen en este estado y si conservan algún grado de funcionalidad [23].

REGULACIÓN DE LOS MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

Dado el papel fundamental que desempeñan los procesos de apoptosis y necrosis en la muerte neuronal que se detecta en enfermedades neurodegenerativas y durante el envejecimiento fisiológico [74-76], parece oportuno detenerse a considerar algunos de los mecanismos que regulan ambos procesos y que se encuentran, en gran medida, ligados a la capacidad de autoduplicación de las células [78]. Más aún, los trabajos pioneros de Judith Campisi [79] y otros más recientes [80], que en su conjunto han evaluado la función de un elevado número de genes, han llegado a las siguientes conclusiones: 1. Que al menos un 1% de todos los genes valorados sufren alteraciones edad-dependientes, y 2. Que muchos de los genes alterados están relacionados con la proliferación celular.

No todas las células de un organismo tienen la capacidad de proliferar indefinidamente. Es un hecho conocido, desde las ya famosas experiencias de Hayflick [81], que las células tienen limitada su capacidad proliferativa, de forma que las procedentes de individuos viejos se dividen un menor número de veces que las procedentes de embriones o de individuos jóvenes. La proliferación celular viene marcada por un proceso cíclico que incluye diferentes etapas (Fig. 2). Durante el desarrollo de dicho proceso, es necesario que se conjugue la expresión de una serie de genes que codifican, por un lado, ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (cdk) (regulados por diferentes factores de crecimiento), y de otro, determinados productos génicos, que actúan directa o indirectamente sobre los anteriores, bien para desencadenar proliferación (protooncogenes) o por el contrario para inhibirla (genes supresores de tumores) [82].

Dentro de los protooncogenes destacan el responsable de la proteína ras, implicada en mecanismos de transducción de señales, así como los genes *myc*, *fos* y *jun*, que codifican factores de transcripción implicados en la activación del ciclo celular en respuesta a factores de crecimiento y en el desencadenamiento de cambios en el patrón de expresión génica responsable del control de los complejos ciclinas-cdk [83].

Entre los genes supresores de tumores destacan el gen responsable de la proteína del retinoblastoma (Rb), que actúa bloqueando determinados factores de crecimiento e impide que la célula pase desde la etapa G1 a la etapa S [84], la fosfoproteína p53, que actúa como factor de transcripción sobre el gen responsable de la proteína p21, la cual, a su vez, inactiva la formación del complejo ciclina G1-cdk. Además, la proteína p53 tiene una probada capacidad apoptótica [85,86]. De hecho, tanto los protooncogenes como los genes supresores de tumores, junto a otros responsables de la puesta en marcha del propio proceso de destrucción celular, son los encargados de regular los mecanismos apoptóticos.

De forma muy genérica, y en relación con lo anterior, se puede decir que existen dos grupos de genes responsables de la activación o represión del programa de apoptosis: los genes promueve y los genes provida. Los primeros codifican produc-

tos que activan la apoptosis, a través de la inducción de un conjunto de genes como *bax*, *bad*, *bak*, *bik*, *nuc1*, *mec* y el sistema *fas/fas-L* [86-88]. Concretamente, se tienen evidencias de la actuación de fas en los mecanismos de disparo de muerte celular que ocurren en diferentes situaciones, entre ellos los desencadenados en procesos neurodegenerativos [88]. Entre los genes promueve también se encuentran los responsables de las endonucleasas que rompen ADN o los de las peligrosas caspasas, cisteinproteinasas calciodependientes encargadas de la ejecución directa del programa de destrucción celular [89]. Finalmente, los genes supresores de tumores, a los que hemos aludido con anterioridad y que inhiben la proliferación, también se les considera dentro del grupo de los genes promueve.

Los genes provida son responsables de inactivar los sistemas de destrucción celular, bien a través de la inhibición de caspasas y endonucleasas, o activando sistemas de protección celular (p. ej., las enzimas antioxidantes); también los protooncogenes *myc*, *fos* y *jun*, inductores de proliferación celular se consideran genes provida. Además, genes como *survivin*, *naip* [89], y otros como *ced-9*, *bcl-2* y *bcl-x_L* son directamente responsables de inhibir el programa de muerte celular [87].

Aunque recientemente existe una gran controversia [55], se piensa que el límite a la proliferación celular podría depender de la pérdida de algunos de los genes, que como *fos* inducen proliferación (protooncogenes). Se sabe que cada vez que la célula se divide, los extremos de los cromosomas, zonas denominadas telómeros, se acortan con la pérdida consiguiente de información genética. Este acortamiento no ocurre en células como las germinales o las cancerosas, gracias a la presencia en las mismas de la telomerasa, un complejo enzimático que repone las zonas del ADN perdido y que confiere a las células que la poseen un fenotipo inmortal [79]. Sin embargo, la evolución y consecución de la senescencia no ocurre en especies en las que todas sus células (incluidas las neuronas) están sometidas a continuo recambio, como ocurre por ejemplo en las hidras de agua dulce, que son organismos carentes de un reloj biológico que les marque su esperanza de vida [90].

TEORÍAS SOBRE ENVEJECIMIENTO CELULAR

Aunque son muchas las teorías emitidas en las últimas décadas sobre el envejecimiento, sólo algunas de ellas, como la de los radicales libres [91], han resistido exitosamente el paso del tiempo. No obstante, esta teoría por sí sola no es capaz de dar una idea global que explique adecuadamente el proceso de senescencia que conduce a la muerte. Recientemente se ha propuesto, tomando como modelo los nematodos, una teoría tripartita que integra las evidencias experimentales que apoyan al estrés oxidativo como principal fuente del deterioro celular y orgánico propio del envejecimiento, con la teoría del soma desechable o evolutiva, basada en el efecto de la selección natural sobre la expresión de los genes que lleva a la senescencia tras la reproducción. Además, y como tercer elemento integrador, se consideran las claves que permiten explicar las dispares expectativas de vida que presentan entre sí las diferentes especies e incluso los distintos individuos de la misma especie [55]. Esta forma integrada de abordar el proceso de senescencia ofrece una perspectiva más completa del mismo, por lo que en lugar de llevar a cabo una descripción general de las diferentes teorías emitidas, consideramos más acertado un análisis de los mecanismos disparadores así como de las posibles rutas metabólicas que indu-

cen el deterioro de células y tejidos, para lo cual tomaremos como modelo diferentes patologías relacionadas con el envejecimiento cerebral.

En enfermos que sufren procesos neurodegenerativos, accidentes vasculares, epilepsia o cualquier otra enfermedad de este tipo, se conoce que la deficiencia de factores neurotróficos, la falta de suministro energético por hipoxia, hipoglucemia o isquemia, la producción de daño excitotóxico y el estrés oxidativo, son las causas que disparan el programa de deterioro y muerte celular. Sin embargo, todas estas causas, lejos de ser independientes, están íntimamente relacionadas y, además, son inductoras de muchos de los genes relacionados con la edad que se han citado con anterioridad.

FACTORES DE CRECIMIENTO

Como ya se ha mencionado, la falta o escasez de determinados factores de crecimiento puede ser causa de apoptosis. Además, en el caso de las neuronas, se ha comprobado que, durante el desarrollo, aquellas que no llegan a alcanzar sus dianas o no realizan los contactos adecuados se suicidan por apoptosis [92]. Posiblemente la falta de modulación, por parte de determinados factores de crecimiento, de los complejos ciclinas-cdk sea uno de los motivos que conducen a la apoptosis; además, la ausencia de inducción de los genes responsables de la síntesis de determinadas enzimas antiestrés [93], o incluso la acción de tales factores sobre determinadas proteínas secuestradoras de calcio, como la calbindina, probablemente también influya en el desarrollo de la apoptosis [94], y finalmente, la falta de represión de la maquinaria de muerte celular por parte de determinados factores tróficos puede ser otro de los mecanismos de disparo del proceso de muerte, dado que las caspasas y endonucleasas inactivas están presentes en todas las células [95]. En este sentido, el suministro de determinados factores neurotróficos como el factor de crecimiento de las células nerviosas, la neurotrofina 3, o el factor neurotrófico derivado de cerebro, podrían constituir una terapia protectora en muchas enfermedades neurodegenerativas [96].

DEFICIENCIAS EN EL SUMINISTRO ENERGÉTICO

Se sabe que los requerimientos energéticos de las neuronas están muy por encima de los de las demás células del organismo. Tales requerimientos derivan fundamentalmente de la necesidad de abastecer de energía (ATP) de forma continuada a la bomba de Na^+/K^+ presente en su membrana, y de cuyo funcionamiento dependen, entre otros procesos, tanto la homeostasis iónica como el mantenimiento del potencial de membrana, aspecto este último de suma importancia en la fisiología neuronal. De hecho, más del 40% del ATP producido por la mitocondria se destina a este fin [97]. Es evidente que los sustratos que alimentan el proceso de fosforilación oxidativa deberán estar disponibles de forma permanente en la neurona. Entre estos sustratos se cuentan fundamentalmente la glucosa y el oxígeno, por lo que resulta evidente que sean las situaciones de hipoglucemia e hipoxia, que pueden ocurrir durante un proceso de isquemia, las que determinen la inhibición de la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, de la producción de ATP [98].

La neurona, a diferencia de otras células del organismo, no presenta almacenes glucídicos en forma de glucógeno; realmente, es una célula glial, el astrocito, la encargada de proveer

de glucosa a la neurona. Los glucocorticoides, que reducen la captura de glucosa por la neurona provocan neurotoxicidad [99]. En los enfermos de Alzheimer se ha detectado que los fenómenos de hipoglucemia provocan mayor neurotoxicidad por parte del β -amiloide [100]. No obstante, cabe destacar que una pérdida transitoria de sustratos no es inmediatamente letal; se sabe que las neuronas pueden sobrevivir tras períodos de hipoglucemia e hipoxia, aunque cuando se dan simultáneamente ambas causas, el proceso neurodegenerativo resulta más rápido [101]. Por otra parte, se ha podido saber que aún más dañino que la propia isquemia resulta el proceso de reperfusión posterior; esta situación se debe a la formación de radicales libres que tiene lugar por la reoxigenación que sucede a la hipoxia [102,103].

EXCITOTOXICIDAD

Los aminoácidos aspartato y glutamato son los neurotransmisores excitadores (AAE) más comunes del SNC [104,35]. Cuando son liberados de la terminal presináptica interactúan con la neurona postsináptica a través de dos tipos generales de receptores. Los primeros corresponden a receptores ionotrópicos, que están acoplados a canales de compuerta iónica, como AMPA, kainato o NMDA. Los segundos son receptores metabotrópicos que se encuentran acoplados a proteínas G, como el LPA-4 o el ACPD [105]. En ambos casos su acción neurotransmisora finaliza por mecanismos de recaptación que son neuronales en un 80% [106] y gliales en un 20% [107].

Olney [108] observó que los AAE actúan como potentes neurotoxinas cuando se acumulan en el espacio intercelular, situación que puede ocurrir bien porque sean liberados en exceso o porque fallen los mecanismos de recaptación de los mismos. Son múltiples las causas que desencadenan excitotoxicidad; de hecho, se ha observado que la pérdida de homeostasis iónica, la depleción de reservas energéticas, los procesos de isquemia, las lesiones traumáticas, las enfermedades neurodegenerativas y, por supuesto, el envejecimiento, provocan despolarización excitatoria y, por consiguiente, la liberación de AEE [108]. En este último caso, trabajos realizados por nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que el envejecimiento produce una elevación significativa de los niveles de glutamato, aunque no ocurre así con otros aminoácidos neurotransmisores [21].

Se ha implicado fundamentalmente al receptor NMDA como responsable del disparo del proceso de toxicidad que podría tener lugar mediante dos vías diferentes [109]. La primera de ellas, denominada de excitotoxicidad aguda, es provocada por agonistas glutamatérgicos y supone la entrada masiva de Na^+ hacia el interior de la célula, que a su vez arrastraría Cl^- y H_2O , llevando a un hinchazón excitotóxico con aumento del volumen celular, que acabaría conduciendo a la lisis osmótica de la célula y, por consiguiente, a su muerte mediante mecanismos de necrosis. La excitotoxicidad retardada está mediada por una elevación del calcio citosólico, que a su vez activa a una serie de enzimas calcio dependientes tales como la fosfolipasa A2, proteinasas, endonucleasas, e incluso a la óxido nítrico sintasa (NOS) [110]. Todas estas enzimas disparan cascadas metabólicas que en última instancia pueden provocar daño y muerte celular por apoptosis. Además, se ha observado que el proceso acarrea inhibición de la síntesis de proteínas e incremento de la producción de radicales libres [111].

ESTRÉS OXIDATIVO

Como consecuencia del elevado metabolismo oxidativo que tiene lugar en las neuronas, en combinación con la presencia de iones metálicos, que como el Fe^{2+} , catalizan la formación de radicales libres, se generan estas especies reactivas que como veremos son potencialmente tóxicas. Estas sustancias se acumulan con el paso del tiempo en las células del tejido nervioso, provocando daños irreparables que pueden conducir a la muerte neuronal [112] (Fig. 3). Otros factores, como la oxidación del ácido araquidónico, de la dopamina o de la xantina, también generan este tipo de radicales [113]; así, aquellas zonas cerebrales en las que abundan estas sustancias son las más susceptibles a padecer ataques oxidativos, los cuales provocan daños irreparables como los descritos con anterioridad, que son desencadenantes de enfermedades neurodegenerativas como el corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la de Alzheimer [114]. En estas patologías se ha detectado un descenso en la actividad de los complejos mitocondriales I y IV, junto a un elevado nivel de moléculas oxidadas [113]; estas deficiencias del proceso respiratorio, que tienen lugar como consecuencia de la acumulación de daño oxidativo, también se han observado en el envejecimiento fisiológico de especies tan dispares como la mosca de la fruta [115], la rata [116] e incluso el hombre [117].

Los radicales libres de oxígeno son átomos o moléculas que presentan un electrón desapareado, peculiaridad que les hace altamente reactivos frente a moléculas vecinas a las que provocan daños oxidativos irreparables. Los radicales libres que producen mayor toxicidad corresponden al ion superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH), el agua oxigenada (H_2O_2), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) [114, 118]. Estas especies reactivas pueden inferir a células y tejidos un daño primario al oxidar directamente a moléculas como los lípidos—fundamentalmente ácidos poliinsaturados de las membranas—, proteínas—principalmente enzimas—o ácidos nucleicos, en este último caso con el consiguiente riesgo de mutaciones [119, 120]. De forma secundaria, también pueden provocar la inhibición de la recaptación de AEE de modo concomitante o no con la estimulación de este tipo de neurotransmisores [121], además de disparar la activación de enzimas proteolíticas como las caspasas o las endonucleasas [122]. Ahora bien, las células poseen mecanismos de defensa antiestrés que les permiten inactivar radicales libres y sustraerse a su capacidad oxidativa [123]. Se ha calculado que, por término medio, las células reciben unos 100.000 impactos oxidativos diarios, que son neutralizados en gran medida por las defensas antiestrés mencionadas. Concretamente, uno de los mecanismos más eficaces de inactivación corresponde a la enzima superóxido dismutasa (SOD), que transforma el ion superóxido (O_2^-) en agua oxigenada (H_2O_2), y a la glutatión peroxidasa (GSP), que transforma esta última en agua [123]. Ahora bien, el paso del tiempo puede deteriorar estos sistemas, como se ha podido comprobar en las experiencias realizadas con jerbos que mostraron que los animales más viejos presentaban una tasa más elevada de moléculas dañadas por oxidación que sus congéneres jóvenes. Además, cuando a estos animales viejos se les suministró una droga antioxidante, pudo detectarse una disminución en la cantidad de moléculas oxidadas y, lo que es más importante, la evaluación de diferentes parámetros cognitivos respecto a su comportamiento en un laberinto indicó una cierta recuperación de la destreza juvenil [124, 125].

Otra de las enzimas integrantes de las defensas antiestrés

corresponde a la glutatión S-transferasa (GST). Se trata de una familia de isoenzimas implicadas en fenómenos de detoxificación. De hecho, existen un gran número de evidencias experimentales que indican que estas isoenzimas confieren resistencia ante carcinógenos, drogas antitumorales, tóxicos ambientales y estrés oxidativo. En este último caso actúan a través de la inactivación de metabolitos que contienen grupos carbonil, peróxido y epóxido, generados como consecuencia de los impactos oxidativos producidos por los radicales libres [126]. Recientemente en nuestro laboratorio hemos estudiado, en cerebro y cerebelo de animales viejos, la expresión de algunas isoenzimas de la GST mediante *western blotting* e inmunocitoquímica. Los resultados obtenidos indicaron que el envejecimiento produce inducción y cambio en el patrón de expresión de estas isoenzimas [127]. Los mecanismos que inducen la expresión de defensas antiestrés, como las GST, parece ser que responden a sistemas de transducción de señales que se inician a través de un sensor para radicales libres, que actuaría sobre determinados factores de transcripción como Fos, Jun, Maf y Nrl. Estos factores podrían combinarse entre sí para formar ciertos tipos de heterodímeros encargados, a su vez, de activar alguno de los genes responsables de estas enzimas detoxificadoras [126].

Los radicales libres se generan en mayor cuantía conforme la tasa metabólica se eleva (mayor consumo de oxígeno). De hecho, las especies más longevas, por ejemplo el hombre, tienen una tasa metabólica más baja y muestran más elevadas defensas antiestrés que las especies menos longevas como el ratón, la mosca de la fruta o el nematodo *Caenorhabditis elegans* [7]. Otra cuestión importante es el hecho conocido de que las dietas restrictivas, que en cierta medida permiten bajar la tasa metabólica, prolongan la vida de individuos que se sometieron a ellas a partir de la edad adulta [128].

ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO), una molécula neuromoduladora, es en sí misma un radical libre [129]. En los sistemas vivos, el NO es producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que cataliza la transformación de la arginina en citrulina con la formación de cantidades equimoleculares de NO. Esta reacción es dependiente de Ca^{2+} -calmodulina y utiliza FMN, FAD y tetra biopterina como cofactores [130, 131]. Se han descrito tres isoformas de la NOS: dos de ellas actúan de forma constitutiva y corresponden a la NOS-I, también denominada nNOS por estar presente principalmente en neuronas, y a la NOS-III, o eNOS por su localización inicial en endotelio vascular; la expresión de la tercera isoforma requiere la presencia de inductores como las citocinas o el LPS, por lo que se le denomina iNOS, corresponde a la NOS-II, y se detecta fundamentalmente en células del sistema inmune, aunque puede ser inducida en prácticamente cualquier tipo celular [132].

El NO actúa como neuromodulador sobre la célula diana mediante la activación de la guanilato ciclasa, la cual produce un mensajero intracelular, el cGMP, que puede, a su vez, poner en marcha diferentes mecanismos fisiológicos (Fig. 4). Concretamente a nivel de determinados circuitos neuronales del hipocampo, la liberación de NO desencadena potenciación a largo plazo, y a nivel de cerebelo depresión a largo plazo [133]. Estos mecanismos fisiológicos intervienen en los procesos de memoria y aprendizaje, habiéndose postulado que los cambios detec-

tados en los niveles de producción de NO en ciertas regiones del cerebro de animales viejos podrían ser la base de las pérdidas de memoria y aprendizaje propias de la vejez [134, 135].

Sin embargo, los mecanismos de actuación del NO resultan bastante más complejos y ha podido constatar que cuando es producido en exceso, puede llegar a inducir cascadas tóxicas (Fig. 4), bien de forma indirecta, mediante la activación de los mecanismos responsables de la liberación de aminoácidos excitotóxicos (AAE) [136], o bien de forma directa por su capacidad de unirse a otros radicales libres [137]. Concretamente, el NO puede unirse al ion superóxido (O^-) para originar peroxinitrito (ONOO $^-$), que a su vez puede nitrar residuos de tirosina de determinadas proteínas, impidiendo las interacciones funcionales de las mismas a través de estos residuos y poniendo en peligro la viabilidad celular [138]. Además, el ONOO $^-$ no solamente es tóxico en sí mismo, sino que además se descompone en dióxido de nitrógeno (NO_2) e hidroxilo (OH $^\cdot$), siendo este último uno de los radicales libres más tóxico en cuanto a su potencial de reacción [139]. De esta forma, el NO contribuye considerablemente al daño oxidativo que tiene lugar en determinadas enfermedades neurodegenerativas y en el propio envejecimiento. En esta línea, numerosos investigadores están reconduciendo las posibles causas del deterioro y muerte neuronal que concurren en los procesos de isquemia [140] y en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas [141, 142], como una consecuencia de la acción tóxica del NO. Recientemente se ha demostrado que las células microgliales presentes en las placas seniles de los enfermos de Alzheimer muestran actividad iNOS, de forma que la producción de NO por estas células podría estar en la base de la muerte neuronal que se produce en las zonas afectadas [143]. En nuestro laboratorio estamos realizando diferentes trabajos dirigidos a desentrañar el papel del NO durante el envejecimiento y los procesos de isquemia. En el envejecimiento, hemos podido constatar que tiene lugar un cambio en el patrón de expresión de las distintas isoformas de la NOS, tanto en lo que se refiere a los tipos celulares responsables, como a las zonas afectadas; concretamente, se ha detectado en la corteza un aumento en la expresión, particularmente de la iNOS, que además no sólo se detecta en microglía, sino también en astrocitos e incluso en neuronas [144]. La detección de nitrotirosina es otro de los aspectos que estamos abordando en nuestros trabajos, ya que recientemente, hemos obtenido un anticuerpo altamente específico contra residuos de tirosina nitrosilados, el cual estamos utilizando para dilucidar el grado de nitrosilación que producen diferentes situaciones experimentales, entre ellas envejecimiento [144]. Como se ha comentado anteriormente, la nitrosilación de proteínas es un marcador del efecto neurotóxico del NO y los resultados obtenidos hasta el momento indican un incremento de nitrotirosina en corteza cerebral de animales viejos [144]. Dado el papel dual atribuido al NO, estos resultados también podrían relacionarse con el papel neuroprotector del NO, ya que recientemente se ha demostrado su actuación como sustancia antiapoptótica, aunque este efecto es dosisdependiente [145].

PÉRDIDA DE LA HOMEOSTASIS DE CALCIO

Finalmente, hay que comentar que en todas las situaciones comentadas hasta el momento, se producen elevaciones sustanciales de las concentraciones de un mensajero intracelular, el calcio, que es capaz de desencadenar una cascada de señales

químicas que activan los genes apoptóticos [87, 146]. Concretamente el aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico activa determinados enzimas Ca^{2+} -dependientes como son las fosfolipasas, proteasas, endonucleasas y la propia NOS, todas ellas implicadas en la ejecución del programa de muerte celular [147]. Estos aumentos de la concentración de Ca^{2+} citosólico son causados por el influjo de Ca^{2+} extracelular que penetra por canales acoplados a receptores regulados por voltaje o agonistas como es el caso ya comentado de los receptores de glutamato, NMDA [148].

Cuando el Ca^{2+} penetra en la célula, ésta tiende a estabilizar el aumento de su concentración mediante captura y almacenaje del catión en depósitos intracelulares tales como el retículo endoplasmático (RE) y los calciosomas, utilizando para ello bombas metabólicas dependientes de ATP. La mitocondria también almacena calcio, mediante un transportador de tipo uniporte dependiente de voltaje presente en su membrana. No obstante, la captura de calcio por los orgánulos citados puede ser ineficaz cuando los mecanismos que inducen su entrada en la célula persisten al no cesar la causa inductora. Por ejemplo, la unión de glutamato a NMDA no sólo provoca la apertura de canales de calcio, sino que también activa a la fosfolipasa C de la membrana que transforma el fosfoinositol bifosfato (PIP $_2$) en fosfoinositol trifosfato (IP $_3$) y diacilglicerol (DG). El IP $_3$ abre canales de calcio en el RE, y la propia elevación del calcio determina la apertura de canales en los calciosomas. Estas salidas masivas de calcio, desde estos almacenes intracelulares hasta el citosol, hacen que la bomba de Ca^{2+} ATP-dependiente que lo introduce en su interior resulte totalmente ineficaz [149].

Sin embargo, no son éstas las únicas causas del mantenimiento de los niveles elevados de Ca^{2+} citosólico, la mitocondria también desempeña un importante papel [150]. Así, como ya se ha comentado, este orgánulo también actúa como reservorio de Ca^{2+} , el cual penetra en su interior gracias a un transportador de tipo uniporte que funciona ininterrumpidamente mientras se mantenga el potencial de membrana mitocondrial. Este Ca^{2+} citosólico que entra en la mitocondria es utilizado para la activación de determinadas deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; además, su salida de la mitocondria por un mecanismo de cotransporte permite la introducción simultánea de Na^+ desde el citoplasma al interior de la mitocondria. A su vez, este Na^+ mitocondrial es cotransportado de nuevo al hialoplasma permitiendo la entrada de H^+ al interior mitocondrial. Se crea, de esta forma, un gradiente de H^+ que resulta imprescindible para que puedan darse las condiciones que permiten el desarrollo del proceso de fosforilación oxidativa, es decir, de generación de energía en forma de ATP. Así, es sabido que una ATPsintasa presente en la membrana mitocondrial utiliza la energía almacenada en el gradiente de protones para generar ATP. Sin embargo, todo este sistema puede desequilibrarse como consecuencia de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial [151]. La pérdida de potencial se debe fundamentalmente a que en la mitocondria puede abrirse de forma más o menos transitoria un poro (MPTP, del inglés *Mitochondrial Permeability Transition Pore*) que de forma inespecífica deja salir hacia el hialoplasma iones y moléculas inferiores a 1,5 kDa, entre ellos Ca^{2+} . De esta forma se disipa el potencial de membrana y la ATPsintasa, que, como se ha indicado funcionaba gracias al gradiente de H^+ , puede incluso funcionar a la inversa gastando ATP en lugar de generarlo.

Aunque se especula con las causas que provocan la apertu-

ra del poro mitocondrial, se conocen ya algunos aspectos indicativos del posible mecanismo regulador. Así, se ha comprobado que la ciclosporina A (CsA), un inmunosupresor, evita la apertura del poro, mientras que, por el contrario, elevadas concentraciones de Ca^{2+} citosólico y el estrés oxidativo activan su apertura [152]. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial no sólo implica reducción de los mecanismos productores de energía, sino que ello redundará en la pérdida de la homeostasis celular, que a su vez implica nuevos aumentos de Ca^{2+} citosólico y, por consiguiente, la autoalimentación de un proceso que acaba provocando muerte celular mediante necrosis o apoptosis.

BASES MOLECULARES DE LA MUERTE NEURONAL

Finalmente, unir los hallazgos de todos estos trabajos, que recrean las causas inductoras del deterioro y muerte neuronal, con los datos genéticos existentes en la literatura, es uno de los retos que se están empezando a abordar en la actualidad. Así, se ha propuesto la hipótesis de que la inducción de determinados genes implicados en los procesos de muerte celular, como el gen *bax*, sería uno de los posibles mecanismos disparadores de la apertura del poro mitocondrial. Por el contrario, proteínas como *Bcl-2* que han sido localizadas en la membrana plasmática, en la del RE y también en las de las mitocondrias, podrían actuar como sensores, que en este último caso impedirían la apertura del poro mitocondrial [153].

Actualmente se baraja la idea de que los mecanismos que disparan la apoptosis o la necrosis sean activados por estímulos similares que sólo difieren en el grado de intensidad. Experiencias con neuronas cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de glutamato así lo avalan [154]. De esta forma, la exposición de los cultivos a cantidades moderadas de glutamato provoca apoptosis, mientras que la exposición de las neuronas a concentraciones elevadas de este AAE provoca hinchazón neuronal y necrosis.

Si la causa inductora y, por consiguiente, la apertura del poro es transitoria, los cambios sufridos por la mitocondria ponen en marcha un sistema más retardado de muerte celular que acaba conduciendo a apoptosis. Se piensa que estos cambios, que aparentemente no dañan en primera instancia la integridad mitocondrial, permiten la salida de determinadas proteínas inductoras, como el citocromo c, que induce la activación de Apaf 1; esta última activa a su vez las correspondientes caspasas, obteniéndose como resultado final apoptosis. Si, por el contrario, la causa inductora es sostenida también lo es la apertura del poro, y la mitocondria sufre un daño osmótico que conduce a la típica hinchazón mitocondrial, con ruptura de membrana interna y salida del contenido de la matriz mitocondrial. Además, la caída del potencial que tiene lugar desacopla la síntesis de ATP y provoca la aparición de nuevas especies reactivas de oxígeno, con resultado final de muerte por necrosis. Por otro lado, no hay que descartar en esta segunda hipótesis la liberación simultánea de factores inductores de apoptosis y proteínas mitocondriales (citocromo c), que a su vez inducen la cascada de eventos que llevan a la destrucción celular [155].

Otro aspecto de carácter genético que parece subyacer al proceso de envejecimiento y muerte celular corresponde a la inducción y represión de genes de proteínas G como *Ras-2*; estas proteínas, implicadas en fenómenos de transducción de señales, desempeñan papeles de sumo interés en la determinación de la longevidad de las células tal y como se ha demostrado en levaduras [55].

Ahora bien, aunque parece evidente que las interacciones que conducen al envejecimiento y a la muerte de las células están en la base no sólo del envejecimiento del organismo en su conjunto, sino también en la de los procesos patológicos que subyacen a las enfermedades neurodegenerativas, llegar a extrapolar los datos genéticos procedentes de organismos sencillos como las levaduras, los nematodos o la mosca de la fruta, a los procesos de envejecimiento en humanos, aún requiere un amplio camino que la ciencia deberá recorrer en los años venideros.

BIBLIOGRAFÍA

- Warner HR, Hodes RJ, Pocinki K. What does cell death have to do with aging? *JAGS* 1997; 45: 1140-6.
- Peinado MA. Histology and histochemistry of the aging cerebral cortex: an overview. *Microscopy Res Tech* 1998; 43: 1-7.
- Nagley P, Wei YH. Ageing and mammalian mitochondrial genetics. *Trends Genet* 1998; 14: 513-7.
- Jazwinski SM. Genetics of longevity. *Exp Gerontol* 1998; 33: 773-83.
- Jazwinski SM. The RAS genes: a homeostatic device in *Saccharomyces cerevisiae* longevity. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 471-8.
- Kirkwood TB, Rose MR. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1991; 332: 15-24.
- Rose MR. Can human aging be postponed? *Sci Am* 1999; 281: 106-11.
- Mrak RE, Griffin ST, Graham DI. Aging-associated changes in human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 1269-75.
- Newberg AB, Alavi A. Neuroimaging in the in vivo measurement of regional function in the aging brain. In Dani SU, Hori A, Walter GF, eds. *Principles of Neural Aging*. Amsterdam: Elsevier Science; 1997. p. 397-408.
- Becker H. Imaging the aging brain. In Dani SU, Hori A, Walter GF, eds. *Principles of Neural Aging*. Amsterdam: Elsevier Science; 1997. p. 375-93.
- Jellinger KA. Morphology of the aging brain and relation to Alzheimer disease. In Calne DB, Horowski R, Mizuno Y, Poewe WH, Riederer P, Youdim MBH, eds. *Advances in Research on Neurodegeneration*. Vol. I. Boston: Birkhäuser; 1993. p. 107-37.
- Giannakopoulos P, Hof PR, Bouras C. Selective vulnerability of neocortical association areas in Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 16-23.
- Gómez-Ramos P, Morán MA. Ultrastructural aspects of neurofibrillary tangle formation in aging and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 49-58.
- Cotman CW, Peterson C. Aging in the nervous system. In Siegel GJ, Agranoff B, Albers RW, Molinoff P, eds. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 4 ed. New York: Raven Press; 1989. p. 523-40.
- Ishimaru H, Ogawa S, Fujii K, Fukuta T, Kameyama T, Nabeshima T. Age-related changes in learning and memory, choline acetyltransferase activity and number of neuronal cells in rats. *J Pharmacobiodyn* 1991; 14: 321-5.
- West MJ. Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging* 1993; 14: 287-93.
- Haug H. The aging human cerebral cortex: morphometry of areal differences and their functional meaning. In Dani SU, Hori A, Walter GF, eds. *Principles of Neural Aging*. Amsterdam: Elsevier; 1997. p. 247-61.
- Peters A, Leahu D, Moss MB, McNally KJ. The effects of aging on area 46 of the frontal cortex of the rhesus monkey. *Cereb Cortex* 1994; 4: 621-35.
- Peinado MA, Martínez M, Pedrosa JA, Quesada A, Peinado JM. Quantitative morphological changes in neurons and glia in the frontal lobe of the aging rat. *Anat Rec* 1993; 237: 104-8.
- Peinado MA, Quesada A, Pedrosa JA, Martínez M, Esteban FJ, del Moral ML, et al. Light microscopic quantification of morphological

- changes during aging in neurons and glia of the rat parietal cortex. *Anat Rec* 1997; 247: 420-5.
21. Peinado MA, Martínez M, Ramírez MJ, Quesada A, Pedrosa JA, Iribar C, et al. Neuromorphological changes in neuronal and neuroglial population of the cerebral cortex in the aging rat: Neurochemical correlation. In Jean S, de Vellis JS, eds. *Neuroglia in the Aging Brain*. Totowa, New York: The human Press Inc. (In Press).
 22. Czurkó A, Nishino H. 'Collapsed' (argyrophilic, dark) neurons in rat model of transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience Lett* 1993; 162: 71-4.
 23. Soriano E, del Río JA, Auladell C. Characterization of the phenotype and birthdates of pyknotic dead cells in the nervous system by a combination of DNA staining and immunohistochemistry for 5'-bromodeoxyuridine and neural antigens. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 819-27.
 24. Gallyas F, Zoltay G, Dames W. Formation of dark neurons (argyrophilic neurons) of various origin proceeds with a common mechanism, of biophysical nature (a novel hypothesis). *Acta Neuropathol* 1992; 83: 504-9.
 25. Gallyas F, Zoltay G. An immediate light microscopic response of neuronal somata, dendrites and axons to non-contusing concussive head injury in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 1992; 83: 386-93.
 26. Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM, Iribar-Ibabe C, Peinado Herreros MA. Neuronas picnóticas en la corteza frontal de ratas viejas. Análisis cuantitativo. V Congreso Nacional de la Sociedad Española de Biología Celular. Badajoz, 1993.
 27. Ramírez MJ, Martínez JM, Martínez M, Peinado JM, Peinado MA. Estudio cuantitativo de las neuronas picnóticas en la corteza frontal de ratas con lesiones contralaterales. VII Congreso Nacional de Histología. Jaén, 1993.
 28. Haug H. Are neurons of the human cerebral cortex really lost during aging? In Type J, Traber, Gispen VH, eds. *Senile Dementia of the Alzheimer*. Berlin-Heidelberg: Springer; 1985. p. 150-63.
 29. Jones DG, Calverley RKS. Changes of synapses with age: the respective contributions of non-perforated and perforated synapses in neocortex. In Fujisawa K, Morimatsu Y, eds. *Development and Involvement of Neurons*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press; 1992. p. 249-62.
 30. Cotman CW, Anderson KJ. Synaptic plasticity and functional stabilization in the hippocampal formation: possible role in Alzheimer's disease. *Adv Neurol* 1988; 47: 313-35.
 31. Coleman PD, Flood DG. Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1987; 8: 521-45.
 32. Magistretti PJ. Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters in the central nervous system. *Diabet Metab* 1988; 14: 237-46.
 33. Gage FH, Olejniczak P, Armstrong DM. Astrocytes are important for sprouting in the septohippocampal circuit. *Exp Neurol* 1988; 102: 2-13.
 34. Dutton GR. Astrocyte amino acids: Evidence for release and possible interactions with neurons. In Murphy S, ed. *Astrocytes: pharmacology and function*. San Diego: Academic Press; 1993. p. 173-91.
 35. Thomas RJ. Excitatory amino acids in health and disease. *J Am Geriatr Soc* 1995; 43: 1279-89.
 36. Peinado MA, Quesada A, Pedrosa JA, Torres MI, Martínez M, Esteban FJ, et al. Quantitative and ultrastructural changes in glia and pericytes in the parietal cortex of the aging rat. *Microscopy Res Tech* 1998c; 43: 34-42.
 37. Amenta F, Bronzetti E, Sabbatini M, Vega JA. Astrocyte changes in aging cerebral cortex and hippocampus: a quantitative immunohistochemical study. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 29-33.
 38. Davis EJ, Foster TD, Thomas WE. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 1994; 34: 73-8.
 39. Graeber B, Streit WJ. Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol* 1990; 1: 2-5.
 40. Colton CA. Products of the activate microglia: their role in chronic neurodegenerative disease. In Ling Tan EA, Tan CK, CBC, eds. *Topical Issues in Microglia*. Singapur: Research Neuroscience Association; 1996. p. 255-78.
 41. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 1999; 57: 563-81.
 42. Zielasek J, Hartung HP. Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv Neuroimmunol* 1996; 6: 191-222.
 43. Tamatani M, Ogawa S, Niitsu Y, Tohyama M. Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. *J Neurochem* 1998; 71: 1588-96.
 44. Peinado MA, Ramírez MJ, Pedrosa JA, Martínez M, Quesada A, del Moral ML, et al. Effects of contralateral lesions and aging on the neuronal and glial population of the cerebral cortex of the rat. In Castellano B, González B, Nieto-Sampedro M, eds. *Understanding Glia Cells*. Boston: Kruwer Academic Publishers; 1998b. p. 297-317.
 45. Unger JW. Glial reaction in aging and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 24-8.
 46. Mato M, Ookawara S, Sakamoto A, Aikawa E, Ogawa T, Mitsuhashi U, et al. Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 83269-74.
 47. Morel NML, Hechtman HB, Shepro D. Pericyte modulation of tubular formation and cytoskeletal actin distribution in pulmonary microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol Biochem* 1993; 3: 127-36.
 48. Herman IM, Newcomb PM, Coughlin JE, Jacobson S. Characterization of microvascular cell cultures from normotensive and hypertensive rat brains: Pericyte-endothelial cell interactions in vitro. *Tissue Cell* 1987; 19: 197-206.
 49. Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashita T, Yamashita J, et al. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 28316-24.
 50. Kirkwood TB. Biological theories of aging: an overview. *Aging (Milano)* 1998; 2: 144-6.
 51. Johnson TE. Genetic influences on aging. *Exp Gerontol* 1997; 32: 11-22.
 52. Finch CE. *Longevity, senescence and the genome*. Chicago: University of Chicago Press; 1990.
 53. Rose MR. *Evolutionary biology of aging*. USA: Oxford University Press; 1994.
 54. Longo VD. Mutations in signal transduction proteins increase stress resistance and longevity in yeast, nematodes, fruit flies, and mammalian neuronal cells. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 479-86.
 55. Gems D. Nematode aging: Putting metabolic theories to the test. *Curr Biol* 1999; 9: 614-6.
 56. Mills RG, Weiss AS. Does progeria provide the best model of accelerated ageing in humans? *Gerontology* 1990; 36: 84-98.
 57. Welsh O. Study of a family with atypic progeria. *Mod Probl Pediatr* 1975; 17: 44-58.
 58. Pérez-Tur J. La genética y la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 2000; 30: 161-9.
 59. Rohan de Silva HA, Patel AJ. Presenilins and early-onset familial Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1997; 8: i-xii.
 60. Roses A. Alzheimer diseases: a model of gene mutations and susceptibility polymorphism for complex psychiatric diseases. *Am J Med Genet* 1998; 81: 49-57.
 61. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, et al. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 11183-6.
 62. Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, et al. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 1034-50.
 63. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; 349: 704-6.
 64. Delacourte A. Pathological Tau proteins of Alzheimer's disease as a biochemical marker of neurofibrillary degeneration. *Biomed Pharmacother* 1994; 48: 287-95.
 65. Vanfleteren JR, Braeckman BP. Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 487-502.
 66. Felkai S, Ewbank JJ, Lemieux J, Labbe JC, Brown GG, Hekimi S. CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 1999; 18: 1783-92.
 67. Van Voorhies WA, Ward S. Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 11399-403.
 68. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 1999; 59 (7 Suppl): 1701s-6s.
 69. Duke RC. Apoptosis in cytotoxic T lymphocytes and their targets. *Semin Immunol* 1992; 4: 407-12.
 70. Song Z, Steller H. Death by design: mechanism and control of apoptosis. *Trends Cell Biol* 1999; 9: M49-52.
 71. Snider BJ, Gottron FJ, Choi DW. Apoptosis and necrosis in cerebrovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893: 243-53.
 72. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326: 1-16.
 73. Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 2000; 14:

- 183-8.
74. Nagy ZS, Esiri MM. Apoptosis-related protein expression in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 565-71.
 75. Wullner U, Kornhuber J, Weller M, Schulz JB, Loschmann PA, Riederer P, et al. Cell death and apoptosis regulating proteins in Parkinson's disease—a cautionary note. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; 97: 408-12.
 76. Bennett SA, Tenniswood M, Chen JH, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T, et al. Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *Neuroreport* 1998; 9: 61-6.
 77. Liu X, Zhu XZ. Roles of p53, c-Myc, Bcl-2, Bax and caspases in serum deprivation-induced neuronal apoptosis: a possible neuroprotective mechanism of basic fibroblast growth factor. *Neuroreport* 1999; 10: 3087-91.
 78. Meikrantz W, Schlegel R. Apoptosis and the cell cycle. *J Cell Biochem* 1995; 58: 160-74.
 79. Campisi J. The biology of replicative senescence. *J Cancer* 1997; 33: 703-9.
 80. Ly DH, Lockhart DJ, Lerner RA, Schultz PG. Mitotic misregulation and human aging. *Science* 2000; 287: 2486-92.
 81. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.
 82. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 1998; 35: 461-78.
 83. Reddel RR. Genes involved in the control of cellular proliferative potential. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 8-19.
 84. Kobayashi H. The cell cycle and tumor suppressor genes. *Rinsho Byori* 1996; 44: 3-11.
 85. Choisy-Rossi C, Reisdorf P, Yonish-Rouach E. Mechanisms of p53-induced apoptosis: in search of genes which are regulated during p53-mediated cell death. *Toxicol Lett* 1998; 102-103: 491-6.
 86. Merino JJ, Cordero-Campana MI. Molecular bases of the programmed cell death process: implications of tumor suppressor protein p53 and other proteins in the control of cell cycle. *Mechanisms of apoptotic action. Invest Clin* 1998; 39: 323-58.
 87. Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 887: 18-30.
 88. Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 29-55.
 89. Marks N, Berg MJ. Recent advances on neuronal caspases in development and neurodegeneration. *Neurochem Int* 1999; 35: 195-220.
 90. Martínez DE. Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra. *Exp Gerontol* 1998; 33: 217-25.
 91. Harman D. Free radical theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice. *J Gerontol* 1968; 23: 476-82.
 92. Clarke PG, Posada A, Primi MP, Castagne V. Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother* 1998; 52: 356-62.
 93. Tagliatela G, Pérez-Polo JR, Rassin DK. Induction of apoptosis in the CNS during development by the combination of hyperoxia and inhibition of glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1998; 15: 936-42.
 94. Lipton P, Kalil R. Neurotrophic factors: their role in the development, trauma and disease. *Neural Notes* 1995; 1: 3-7.
 95. Boonman Z, Isacson O. Apoptosis in neuronal development and transplantation: role of caspases and trophic factors. *Exp Neurol* 1999; 156: 1-15.
 96. Fusco M, Vantini G, Schiavo N, Zanotti A, Zanoni R, Facci L, et al. Gangliosides and neurotrophic factors in neurodegenerative diseases: from experimental findings to clinical perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 695: 314-7.
 97. Ames A 3d, Li YY, Heher EC, Kimble CR. Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na⁺ transport. *J Neurosci* 1992; 12: 840-53.
 98. Davis M, Whitely T, Turnbull DM, Mendelow AD. Selective impairments of mitochondrial respiratory chain activity during aging and ischemic brain damage. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1997; 70: 56-8.
 99. Sousa N, Paula-Barbosa MM, Almeida OF. Ligand and subfield specificity of corticoid-induced neuronal loss in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 1999; 89: 1079-87.
 100. Copani A, Koh JY, Cotman CW. Beta-amyloid increases neuronal susceptibility to injury by glucose deprivation. *Neuroreport* 1991; 2: 763-5.
 101. Kaku DA, Goldberg MP, Choi DW. Antagonism of non-NMDA receptors augments the neuroprotective effects of NMDA receptor blockade in cortical cultures subjected to prolonged deprivation of oxygen and glucose. *Brain Res* 1991; 554: 344-7.
 102. Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, Floyd RA. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 5144-7.
 103. Ikeda J, Ma L, Morita I, Murota S. Involvement of nitric oxide and free radical (O₂) in neuronal injury induced by deprivation of oxygen and glucose in vitro. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1994; 60: 94-7.
 104. McGeer EG. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease: idle thoughts on an exciting subject. *Neurobiol Aging* 1989; 10: 614-6.
 105. Farooqui AA, Horrocks LA. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 1991; 16: 171-91.
 106. Shank RP, Campbell GL. Ornithine as a precursor of glutamate and GABA: uptake and metabolism by neuronal and glial enriched cellular material. *J Neurosci Res* 1983; 9: 47-57.
 107. Storm-Mathisen J, Iversen LL. Uptake of [3H]Glutamic acid in excitatory nerve endings: light and electronmicroscopic observations in the hippocampal formation of the rat. *Neuroscience* 1979; 4: 1237-53.
 108. Olney JW. New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl* 1994; 43: 47-51.
 109. Auer RN. Excitotoxic mechanisms, and age-related susceptibility to brain damage in ischemia, hypoglycemia and toxic mussel poisoning. *Neurotoxicology* 1991; 12: 541-6.
 110. Strolin Benedetti M, Dostert P, Marrari P, Cini M. Effect of ageing on tissue levels of amino acids involved in the nitric oxide pathway in rat brain. *J Neural Transm Gen Sect* 1993; 94: 21-30.
 111. Schoneich C. Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. *Exp Gerontol* 1999; 34: 19-34.
 112. Knight JA. Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27: 11-25.
 113. Lees GJ. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 1993; 54: 287-322.
 114. Hogg N. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16: 241-8.
 115. Sohal RS. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging* 1993; 5: 3-17.
 116. Sawada M, Sester U, Carlson JC. Superoxide radical formation and associated biochemical alterations in the plasma membrane of brain, heart, and liver during the lifetime of the rat. *J Cell Biochem* 1992; 48: 296-304.
 117. Jozwiak Z, Jasnowska B. Changes in oxygen-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in human erythrocytes as a function of age of donor. *Mech Ageing Dev* 1985; 32: 77-83.
 118. Herce-Pagliai C, Kotecha S, Shuker DE. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide* 1998; 2: 324-36.
 119. Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 1992; 32 (Suppl): S22-7.
 120. Wei YH, Lu CY, Lee HC, Pang CY, Ma YS. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 155-70.
 121. Pérez Velázquez JL, Frantseva MV, Carlen PL. In vitro ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 1997; 17: 9085-94.
 122. Sapolsky RM. Stress, the aging brain, and the mechanisms of neurons death. A Bradford Book. 1 ed. Massachusetts, London: The MIT Press Cambridge; 1992. p. 117-268.
 123. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiology* 1994; 74: 139-61.
 124. Carney JM, Floyd RA. Protection against oxidative damage to CNS by alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) and other spin-trapping agents: a novel series of nonlipid free radical scavengers. *J Mol Neurosci* 1991; 3: 47-57.
 125. Carney JM, Floyd RA. Brain antioxidant activity of spin traps in Mongolian gerbils. *Meth Enzymol* 1994; 234: 523-6.
 126. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30: 445-600.
 127. Peinado MA, Hernández-Cobo R, Jiménez A, del Moral ML, Pedrosa JA, Rodrigo J, et al. Age-related changes in glutathione-S-transferase isoenzymes in the rat brain. In Castellano B, Nieto-Sampedro M, eds. IV European Meeting on glial cell function in health and disease. *Rev Neurol* 2000. p 46.
 128. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; 273: 59-63.
 129. Dawson TM, Zhang J, Dawson VL, Snyder SH. Nitric oxide: cel-

- ular regulation and neuronal injury. *Prog Brain Res* 1994; 103: 365-9.
130. Knowles RG, Palacios M, Palmer MRJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 5159-62.
 131. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
 132. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
 133. Fedele E, Raiteri M. *In vivo* studies of the cerebral glutamate receptor/NO/cGMP pathway. *Prog Neurobiol* 1999; 58: 89-120.
 134. Noda Y, Yamada K, Nabeshima T. Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. *Behav Brain Res* 1997; 83: 153-8.
 135. Chen J, Zhang S, Zuo P, Tang L. Memory-related changes of nitric oxide synthase activity and nitrite level in rat brain. *Neuroreport* 1997; 8: 1771-4.
 136. Kiedrowski L, Costa E, Wroblewski JT. Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1992; 58: 335-41.
 137. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 737-69.
 138. Beckman JS, Viera L, Estévez AG, Teng R. Nitric oxide and peroxynitrite in the perinatal period. *Semin Perinatol* 2000; 24: 37-41.
 139. Lipton SA, Nicotera P. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium* 1998; 23: 165-71.
 140. Nagayama M, Aber T, Nagayama T, Ross ME, Iadecola C. Age-dependent increase in ischemic brain injury in wild-type mice and in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 661-6.
 141. Dawson TM and Dawson VL. Nitric oxide: actions and pathological roles. *Neuroscientist* (Preview issue) 1994; 9-20.
 142. Beal MF. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol* 1998; 44 (3 Suppl 1): S110-4.
 143. Casamenti F, Prosperi C, Scali C, Giovannelli L, Colivicchi MA, et al. Interleukin-1beta activates forebrain glial cells and increases nitric oxide production and cortical glutamate and GABA release *in vivo*: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1999; 91: 31-42.
 144. Utthental O, Fernández AP, Campbell RO, Moro L, Lizasoain I, Eshteban FJ, et al. Neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivities in the cerebral cortex of the aging rat. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 75-85.
 145. Melino G, Bernassola F, Catani MV, Rossi A, Corazzari M, Sabatini S, et al. Nitric oxide inhibits apoptosis via AP-1-dependent CD95L transactivation. *Cancer Res* 2000; 60: 2377-83.
 146. Siesjö BK, Hu B, Kristian T. Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 19-26.
 147. Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* 1999; 11: 77-85.
 148. Mills LR. The sodium-calcium exchanger and glutamate-induced calcium loads in aged hippocampal neurons *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 15: 379-90.
 149. Paschen W, Doutheil J. Disturbance of endoplasmic reticulum functions: a key mechanism underlying cell damage? *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1999; 73: 1-5.
 150. Rustin P, von Kleist-Retzow J, Vajo Z, Rotig A, Munnich A. For debate: defective mitochondria, free radicals, cell death, aging-reality or mitochondria? *Mech Aging Dev* 2000; 1144: 201-6.
 151. Sugrue MM, Wang Y, Rideout HJ, Chalmers-Redman RM, Tatton WG. Reduced mitochondrial membranes potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p-53-induced senescence. *Biochem Biophys Commun* 1999; 261: 123-30.
 152. Cassarino DS, Bennett JP Jr. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 29: 1-25.
 153. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-12.
 154. Ankarcrona M. Glutamate induced cell death: apoptosis or necrosis? *Prog Brain Res* 1998; 116: 265-72.
 155. Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 170-7.

ENVEJECIMIENTO Y NEURODEGENERACIÓN: BASES MOLECULARES Y CELULARES

Resumen. Objetivo. Se lleva a cabo una revisión actualizada sobre las posibles causas celulares y moleculares que subyacen al proceso de envejecimiento cerebral así como a las enfermedades neurodegenerativas asociadas. Desarrollo. A partir de las lesiones morfológicas e histológicas que se detectan tanto en procesos neurodegenerativos como durante el envejecimiento fisiológico, se analizan las causas que conducen a la pérdida de neuronas y de conectividad nerviosa, así como a los procesos de reactividad glial, como base morfofuncional del deterioro de los procesos cognitivo e intelectual que caracterizan la senescencia. Se correlacionan todos estos datos con las posibles bases genéticas del proceso de envejecimiento, llevando a cabo una revisión de los hallazgos más relevantes sobre senescencia y muerte celular obtenidos en levaduras, mosca de la fruta y nematodos. Tras una breve revisión sobre gerontogenes y mecanismos de apoptosis, se analizan las causas inductoras del proceso de envejecimiento y neurodegeneración, y se interrelacionan las diferentes hipótesis que barajan las teorías más actuales sobre el tema. Finalmente se integran todos los datos celulares, bioquímicos y genéticos, a partir de la puesta en marcha de sistemas de transducción de señales que provocan la elevación de los niveles de calcio citosólico y el disparo del proceso de muerte celular. Conclusiones. Diversas causas inductoras, que pueden activar o inhibir grupos de genes, entre las que se cuentan, deficiencias de factores neurotróficos, hipoxia e hipoglucemia, excitotoxicidad, producción de radicales libres de oxígeno y de nitrógeno, desencadenan procesos de muerte neuronal responsables del envejecimiento y de las enfermedades neurodegenerativas asociadas. [REV NEUROL 2000; 31: 1054-65] [<http://www.revneurolog.com/3111/j111054.pdf>]

Palabras clave. Enfermedades neurodegenerativas. Envejecimiento cerebral. Excitotoxinas. Gerontogenes. Óxido nítrico. Radicales libres de oxígeno.

ENVELHECIMENTO E NEURODEGENERESCÊNCIA: BASES MOLECULARES E CELULARES

Resumo. Objetivo. Leva-se a cabo uma revisão atualizada sobre as possíveis causas celulares e moleculares subjacentes ao processo de envelhecimento cerebral assim como as doenças neurodegenerativas associadas. Desenvolvimento. A partir das lesões morfológicas e histológicas, que se detectam tanto em processos neurodegenerativos como durante o envelhecimento fisiológico, analisaram-se as causas que conduzem à perda de neurónios e de conectividade nervosa, assim como aos processos de reatividade glial, como base morfofuncional da deterioração dos processos cognitivo e intelectual que caracterizam a senescência. Todos estes dados estão correlacionados com as possíveis bases genéticas do processo de envelhecimento, levando a cabo uma revisão dos achados mais relevantes sobre senescência e morte celular obtidos em leveduras, moscas da fruta e nematelmintas. Após uma breve revisão sobre gerontogenes e mecanismos de apoptose, analisam-se as causas inductoras do processo de envelhecimento e neurodegenerescência, e interrelacionam-se as diferentes hipóteses que baralham as teorias mais atuais sobre o tema. Finalmente, integram-se todos os dados celulares, bioquímicos e genéticos, a partir do arranque de sistemas de transdução de sinais que provocam a elevação dos níveis de cálcio citosólico e o início do processo de morte celular. Conclusões. Diversas causas inductoras, as quais podem activar ou inibir grupos de genes, entre as quais se contam deficiências de factores neurotróficos, hipoxia e hipoglicemia, excitotoxicidade, produção de radicais livres de oxigénio e de azoto, desencadeiam processos de morte neuronal responsáveis pelo envelhecimento e doenças neurodegenerativas associadas. [REV NEUROL 2000; 31: 1054-65] [<http://www.revneurolog.com/3111/j111054.pdf>]

Palavras chave. Doenças neurodegenerativas. Envelhecimento cerebral. Excitotoxinas. Gerontogenes. Óxido nítrico. Radicais livres de oxigénio.