

Biología celular y molecular del envejecimiento neuronal. Estado actual y perspectivas

Francisco Javier Alvarez-Leefmans*

Summary

This paper discusses the problem of aging with special emphasis on the causes and course the process follows in the nervous system. Experiments showing that both life-span and life expectancy can be lengthened by molecular genetic techniques, as well as the evolutionary meaning of aging and death are discussed. Several timely questions are posed such as: What is and why does aging occur? Does aging and death have any meaning from the point of view of natural selection? How does aging occur in the nervous system? The latter question is important because in common parlance, and even in the medical environment, it is now customary to consider normal aging and neurodegenerative diseases, such as Alzheimer, as if they were synonyms. This paper challenges this erroneous view by establishing the objective differences between these entities.

The paper also discusses the recent collapse of two established dogmas of neurobiology: first that neurogenesis does not exist in the adult human brain, and second, that normal aging results from loss of neurons. Loss of neurons is thought to be irreversible in the adult human brain, because dying neurons cannot be replaced. This inability to generate replacement cells is thought to be an important cause of neurological disease and aging of the brain. This view is no longer tenable because of recent findings showing that new neurons are generated from dividing progenitor cells in the adult human brain. These findings are related to other investigations showing that, contrary to the commonly held notion that widespread cortical neuronal death is an inevitable concomitant of brain aging, neuron death is scarce and restricted in normal aging and unlikely to account for age-related impairment of neocortical and hippocampal functions. The emerging view is that age-related memory impairment is likely to reflect more subtle structural alterations and molecular changes in specific neurons and circuits that mediate such functions. Both behavioral and electrophysiological studies suggest that key hippocampal circuits are functionally compromised, and that these functional declines do not reflect neuronal loss.

In the final part of the paper, modern theories and facts about cellular aging are reviewed and discussed. Normal human cells undergo a finite number of cell divisions and ultimately enter a non-dividing state called replicative senescence. The latter is dependent upon cumulative cell divisions and not chronologic or metabolic time, indicating that a molecular "mitotic clock" limits proliferation. It has been proposed that shortening of telomeres (specialized structures at the ends of eukaryotic chromosomes involved in chromosome protection, positioning

and replication), is the "molecular clock" that triggers senescence. Telomerase, the enzyme that synthesizes telomeres is not expressed in normal somatic cells, with the exception of ovaries and testes. Telomerase is reactivated in cancer, where immortal cells are likely required to maintain tumor growth. Introduction of telomerase in normal somatic human cells produces extension of life-span of the transfected cells, confirming that telomere shortening regulates the timing of cellular senescence. Ectopic expression of human telomerase immortalizes cells without malignant transformation. The availability of primary human cells with greatly extended or immortal life-span in the absence of malignant transformation will serve as valuable research tools as well as provide therapeutic opportunities for diseases showing premature aging such as Down and Werner syndromes and other age-related conditions.

Key words: Aging, brain aging, neurogenesis, neuronal death, telomerase.

Resumen

En el presente trabajo se analiza el problema del envejecimiento con énfasis en sus causas y en el curso que toma en el sistema nervioso. Se revisa la evidencia experimental que muestra que tanto la esperanza de vida como el límite biológico de la duración total de la misma, pueden alargarse por medio de manipulaciones genéticas. Se discute el significado biológico del envejecimiento y de la muerte desde la perspectiva de la selección natural. Se establecen las diferencias objetivas entre envejecimiento normal y enfermedades neurodegenerativas. Este último constituye uno de los puntos más importantes dado que es común, incluso en ambientes médicos, confundir al envejecimiento normal con las enfermedades neurodegenerativas, particularmente con la enfermedad de Alzheimer. En el presente trabajo se hace un deslinde entre estas dos entidades.

Se analiza el colapso de dos viejos dogmas de la neurobiología: 1) la ausencia de neurogénesis en el cerebro humano adulto y 2) que el deterioro característico de las funciones mentales durante el envejecimiento normal resulta de la pérdida en el número de neuronas. Por mucho tiempo se mantuvo que la pérdida de neuronas en el cerebro humano adulto era un proceso irreversible. Se creyó que las células nerviosas muertas no podían ser reemplazadas por nuevas neuronas porque el tejido nervioso adulto ya no estaba dotado de neurogénesis. Se sostuvo que la incapacidad neurogénica, aunada a una pérdida progresiva en el número de neuronas, constituían el eje central en el devenir de muchas enfermedades neurológicas y en el proceso de envejecimiento cerebral. Estos puntos de vista deben ser reevaluados a la luz de descubrimientos recientes que muestran la formación de nuevas neuronas en el cerebro humano adulto a partir de células progenitoras. Estos hallazgos se relacionan con otros que prueban que la escasa muerte neuronal que ocurre durante el envejecimiento normal, no explica el deterioro en las funciones mentales que le es característico. Este declinar se debe

*Departamento de Farmacología y Toxicología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, 07000 México, D.F.

Departamento de Neurobiología, División de Neurociencias. Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, 14370 México, D.F. Correo electrónico: falvarea@mailier.main.conacyt.mx

a cambios sutiles, morfológicos y funcionales, en ciertos circuitos clave.

En la parte final del trabajo, se analizan las teorías y los hechos más recientes acerca del envejecimiento celular. Las células somáticas normales se dividen un número finito de veces, después del cual entran en un estado llamado "envejecimiento replicativo". El envejecimiento celular está determinado por el número de veces que una célula se divide y no por su edad cronológica o metabólica, por lo cual se ha sugerido la existencia de un "reloj mitótico", que limita la proliferación celular. Se ha sugerido, con base en hechos experimentales, que el acortamiento de los telómeros, es el "reloj molecular" que dispara el fenómeno de senescencia. Los telómeros son los segmentos terminales de los cromosomas, que sirven para cerrarlos y protegerlos. Los telómeros son sintetizados por una enzima, la telomerasa, que no se expresa en las células somáticas, salvo en las germinales de los ovarios y los testículos. La telomerasa se reactiva en las células cancerosas, manteniéndose así la proliferación celular que subyace al crecimiento tumoral maligno. La longevidad de las células somáticas normales puede extenderse significativamente introduciéndoles telomerasa ectópica. Esto comprueba que el acortamiento sucesivo de los telómeros y la longitud de los mismos determinan el tiempo de aparición del envejecimiento replicativo. Más aún, se ha demostrado que la expresión ectópica de telomerasa en células somáticas, las inmortaliza sin malignizarlas. Estos avances hacen factible el que, sin riesgos de malignización, la telomerasa pueda aplicarse como agente terapéutico en enfermedades que presentan envejecimiento prematuro, como los síndromes de Werner y de Down, respectivamente, y en otras condiciones relacionadas con el proceso de senescencia.

Palabras clave: Envejecimiento, envejecimiento cerebral, neurogénesis, muerte neuronal, telomerasa.

El envejecimiento ha sido un tema que ha atraído la atención del hombre desde tiempos bíblicos. Su antídoto, el ansia irremediable de inmortalidad fisiológica, cuyo epítome es "la fuente de la eterna juventud", fue buscado ansiosamente por el Conquistador Juan Ponce de León. Viejo y lastimado por antiguas heridas, Don Juan oyó decir en las Antillas que en región poco alejada existía una isla maravillosa, donde brotaban inexhaustas las linfas del rejuvenecimiento, restauradoras de energías perdidas y de dolencias añejas. Y exploró afanosamente la isla misteriosa en busca del mágico manantial, y ¡Oh decepción!, a pesar de haber bebido en muchas fuentes, tuvo que renunciar, desilusionado, a sus quiméricos anhelos. ¿Cómo puede definirse eso que tanto obsesionaba al incansable Conquistador, que si bien no encontró el manantial de la eterna juventud, descubrió la Península de la Florida?

¿Qué es y por qué ocurre el envejecimiento?

Puede definirse al envejecimiento como un proceso progresivo e irreversible de deterioro, característico de la mayoría de los sistemas vivientes, que en su suceder se acompaña de un aumento, también progresivo, en la probabilidad de muerte, sea ésta de una célula, de un tejido, de un órgano o bien del individuo. El envejecimiento se caracteriza por ser un proceso estocástico y poligénico, modulado por factores ambientales, y por esto último es también susceptible de ser modificado (18). Es estocástico en cuanto a que resulta de la acumulación de una serie de errores de reparación y de mantenimiento metabólicos que ocurren al

azar. Es poligénico porque múltiples genes controlan la duración de la vida del individuo, por ejemplo, regulando funciones específicas de reparación y de mantenimiento. Entre estas funciones destacan las de reparación del DNA; los mecanismos antioxidantes; aquellas implicadas en la supresión de tumores malignos como son los factores que determinan la expresión de la telomerasa (*vide infra*); las del sistema inmune; las del sistema endocrino, etc. Por último, es modificable, como lo indican los cambios en la esperanza de vida, por alteraciones en el ambiente o por mutaciones (8). La maleabilidad del envejecimiento ha podido demostrarse en experimentos realizados en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). Por medio de manipulaciones genéticas se ha podido alargar la vida de estos insectos, demostrando que la extensión del límite biológico de la duración de la vida por los métodos de la biología molecular no es una fantasía (24,31). La hipótesis subyacente a estos experimentos es que los radicales de oxígeno libres y los hidroperóxidos, que son especies moleculares de oxígeno altamente reactivas, son factores causales del envejecimiento. Se cree que los mecanismos antioxidantes que existen en los organismos susceptibles de envejecer, no son suficientes para eliminar a estas especies moleculares de oxígeno reactivo, de tal manera que el exceso de las mismas produce los daños celulares característicos del envejecimiento. Los daños moleculares producidos por estas especies reactivas son, la mayor parte de las veces, irreversibles y se acumulan con la edad, causando el deterioro funcional asociado al envejecimiento. Para probar esta hipótesis, Orr y Sohal (24), sobre-expresaron, en *Drosophila melanogaster*, los genes de dos enzimas antioxidantes: la Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa. La SOD convierte a los radicales aniónicos superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la catalasa transforma al H_2O_2 en agua y oxígeno, eliminando así a los radicales libres. El resultado fue que la duración total de la vida de las moscas transgénicas se alargó hasta en un 33 % con respecto a los animales del grupo control. Más aún, las moscas transgénicas mostraron un nivel significativamente menor de daño oxidativo, una tasa metabólica más alta y una mejor conducta motora a edades mayores que las del grupo control.

Desde el punto de vista "biofilosófico" cabe preguntarse ¿por qué y para qué envejecemos y para qué morimos? Se han postulado un gran número de teorías dirigidas a explicar las causas de estos procesos así como su significado biológico, particularmente desde la perspectiva de la teoría de la evolución. En términos generales puede afirmarse que las causas inmediatas del fenómeno de envejecimiento radican en las limitaciones inherentes a los procesos fundamentales de mantenimiento y reparación del cuerpo, que ya mencioné. Ahora bien, desde una perspectiva teleológica, la finalidad del envejecimiento es la muerte, es decir envejecemos para morir. Desde la perspectiva determinista, morimos porque envejecemos. La realidad es que la mayoría de los seres morimos antes de la culminación del proceso de envejecimiento, por lo que han sido cuestionadas tanto las posiciones finalistas como las deterministas, así como que el proceso en sí tenga

algún valor desde el punto de vista de la selección natural. En otras palabras, dado que la muerte por enfermedades, accidentes y predaciones ocurre antes que la muerte por envejecimiento, aparentemente no habría razón evolutiva para que éste existiese. Su significado aparente no radica en ser un mecanismo de control de la población pues mientras existe un balance entre fuerzas biológicas opuestas, tales como aquellas que promueven la supervivencia *versus* aquellas que promueven la muerte, la población se controlaría por interacciones entre estas fuerzas y no por la senescencia. De acuerdo con esta perspectiva, la fuerza de la selección natural declina con la edad. Conforme envejecemos nuestra contribución a la supervivencia de la especie disminuye (19,20,21). Sin embargo, en mi opinión, es concebible que la muerte del individuo sí contribuya a la supervivencia de la especie (*vide infra*). Paradójico como pueda parecernos, la selección natural favorece a las especies que mueren poco después de haber dejado a sus sucesores, garantizando la supervivencia del grupo, como ya había notado Russell Wallace desde el siglo pasado.

Muchos estudios modernos de demografía muestran de manera irrefutable que existe un sustancial aumento en la esperanza y en la duración de la vida del hombre actual (28,31). La mejor prueba de que el envejecimiento es un proceso maleable, como se mencionó anteriormente, es el hecho de que cada día se incrementa en el mundo el número de centenarios. Esto es reflejo del aumento en la esperanza de vida, resultado de la mejora en las condiciones sanitarias, en la alimentación y en los avances de la medicina. La duración teórica de la vida y la esperanza de vida, tienen un límite que también se ha ido modificando (32). Estas mejoras, que han conducido al aumento en la esperanza de vida, y que han extendido el límite de longevidad biológico, han roto el equilibrio de fuerzas antes mencionado. Esto hace pensar que el significado evolutivo del envejecimiento, tan crudo como esto suene, es asegurarse que el individuo muera y esto es importante pues si fuésemos inmortales además de reproducibles, la supervivencia de la especie se vería seriamente amenazada por un aumento desequilibrado en la competencia por espacios y recursos que son finitos. Elemental, ¿no es así? ¡Ni aun en el terreno del mito, Matusalén fue inmortal! En este sentido, el envejecimiento y la muerte deben ser productos inevitables de la selección natural.

En uno de sus exquisitos y siempre profundos ensayos, escritos con la prosa del poeta, Octavio Paz (25), al hablar de los beneficios de la muerte nos dice que ella, que todo lo destruye, es la madre del cambio:

"Gracias a la muerte de Alejandro fue posible la desintegración de su Imperio; más tarde, la muerte del helenismo hizo posible a Roma. Mueren los imperios, mueren las sociedades y morimos cada uno de nosotros. Este continuo desaparecer hace que los ideales se renueven, que los crímenes se repitan con ciertas exquisitas o sorprendentes variaciones, que las sectas se multipliquen, que un problema sea pensado siempre de manera distinta y en diversas circunstancias y, en suma, que la monotonía de la historia se disfraze con los ropajes de la sorpresa, de la novedad y del

cambio". "Gracias, a la muerte y al miedo que nos inspira, la Vida se modifica siempre con una constancia y una energía terribles, exasperadamente vivas, tanto más vivas cuanto más convencidas estamos de que sólo la muerte nos espera".

¿Cómo envejece el sistema nervioso?

Uno de los órganos en los que se manifiesta de manera más notable el envejecimiento es el cerebro que, en el proceso, sufre el deterioro que conduce a una serie de trastornos en la esfera del juicio, en la cognitiva, en la percepción sensorial y notablemente en la memoria (33). "Archivo de lo pasado, lucimiento del presente y único consuelo de la vejez, la memoria es el don más preciado y maravilloso de la vida" nos dice el gran Cajal en su espléndido libro intitulado: *El Mundo Visto a los Ochenta Años*, subtítulo: *Impresiones de un Arterioesclerótico* (26). Lectura clásica imprescindible para el tema que nos ocupa (fig. 1). Este libro constituye una fuente inagotable de referencias y reflexiones sobre el tema, desde el punto de vista biológico, psicológico y social hasta 1934, el año de su publicación, que coincide con el año de la muerte de su autor. Comienza analizando la decadencia del aparato visual, las maravillas de la audición y su decadencia senil, los trastornos del sueño, la debilidad muscular, pasando desde luego por "las traiciones de la memoria senil". Hace después un recorrido por los cambios que él ha experimentado en el mundo a lo largo de los ochenta y dos años que ha vivido, para llegar a la tercera parte en la que hace una magistral revisión de las teorías de la senectud y de la muerte, finalizando con una cuarta y conmovedora sección que lleva el título de "Los paliativos y consuelos de la senectud".

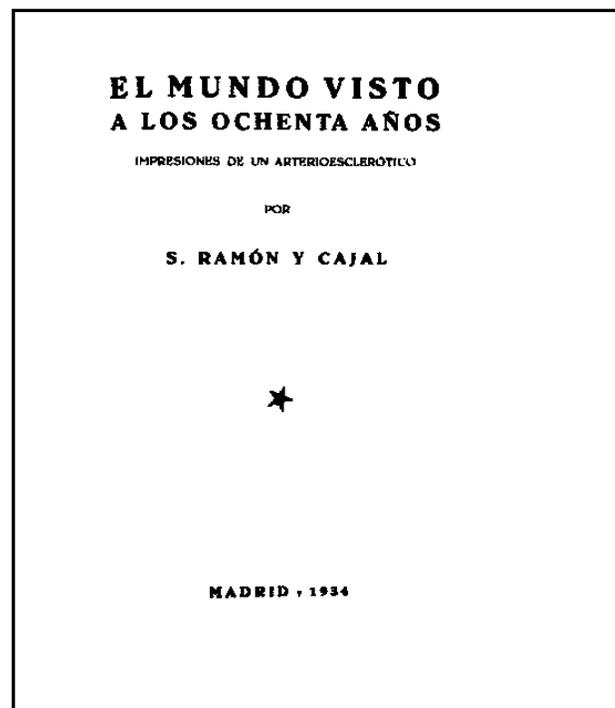


Figura 1. Frontispicio de la primera edición de "El Mundo Visto a los Ochenta Años", de Ramón y Cajal.

Viabilidad neuronal durante el envejecimiento normal

Ya desde la época de Cajal rondaba la idea, más tarde convertida en dogma, de que la muerte neuronal es un resultado inevitable del proceso de envejecimiento normal (*vide infra*). Es decir, conforme envejecemos perdemos neuronas y esto explica el decaimiento en las funciones del sistema nervioso (23). Notable entre estas teorías es la promovida recientemente por Robert Sapolsky, quien ha sugerido que el estrés, a través de la secreción de glucocorticoides, produce muerte neuronal (30). Más aún, este investigador ha demostrado en ratas que conforme éstas envejecen presentan una hipersecreción de glucocorticoides, la cual se acompaña de una pérdida en el número de receptores a corticoides y muerte de las neuronas que los portaban, notablemente en el hipocampo (30). Sin embargo, como veremos más adelante, el tema de la muerte neuronal como causa del envejecimiento normal ha sido recientemente cuestionado. Entonces, ¿a qué se debe el deterioro de las funciones mentales si no existe muerte neuronal? ¿Es posible prevenirlo? ¿Es posible alargar la vida de las células y desde luego la de los individuos? En las líneas que siguen trataré de dar contestación, aunque necesariamente parcial e incompleta, a estas preguntas, pero antes es necesario esclarecer algunos conceptos en torno a lo que se entiende por *envejecimiento normal* del sistema nervioso.

No hay que confundir a las enfermedades neurodegenerativas con el envejecimiento normal

No me referiré como envejecimiento a las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, ni a otras patologías cuya probabilidad de aparición aumenta con la edad tales como la arteriosclerosis, la diabetes del adulto, los accidentes vasculares cerebrales o el cáncer. El asunto que me atañe es tratar de entender lo que sucede en el cerebro durante el envejecimiento normal. El Alzheimer, que muchos identifican erróneamente con el envejecimiento normal del cerebro, no es más que una enfermedad neurodegenerativa, genéticamente determinada, cuya probabilidad de expresión aumenta con la edad. Aunque el Alzheimer es una enfermedad geriátrica, no puede considerarse como un proceso de envejecimiento normal. Como veremos más adelante, el deterioro de las funciones mentales característico del Alzheimer tiene una base biológica distinta a la que subyace al deterioro de estas funciones en el envejecimiento normal (23). Entonces ¿cómo es que las neuronas envejecen normalmente?

El colapso reciente de dos añejos dogmas de la neurobiología abre el camino a nuevas explicaciones del envejecimiento cerebral

En los últimos dos años se derribaron dos dogmas fundamentales de las Neurociencias, que habían permanecido incólumes por varias décadas y que son de gran relevancia para el tema que nos ocupa. El primero de ellos sostenía que los cambios cerebrales que caracterizan al envejecimiento normal, notablemente el deterioro de la memoria, se deben en gran parte a la pér-

da progresiva de neuronas, fundamentalmente neocorticales e hipocámpicas, las cuales mueren sin ser sustituidas (*vide supra*). El otro dogma sostenía no sólo que durante el envejecimiento normal hay muerte neuronal progresiva, sino que, en el cerebro adulto no hay neurogénesis, por lo que una vez que una célula nerviosa muere, ésta se pierde para siempre.

Los estudios que alimentaron el primero de estos dogmas indicaban que con la edad, en la mayoría de las áreas neocorticales y en ciertas regiones del hipocampo, se pierden entre el 25 y el 50 % de las neuronas. Todos estos estudios se caracterizaron por medir la densidad neuronal más que el número total de neuronas en cortes histológicos bidimensionales. Hay además en estos estudios una serie de artilugios debidos a la fijación y a la conservación del tejido, entre otros, que no fueron considerados críticamente, sin mencionar los errores incurridos en los métodos de muestreo (6,23). El desarrollo reciente de técnicas estereológicas que permiten contar neuronas sin sesgos estadísticos ha permitido llegar a la sorprendente conclusión de que, a diferencia de la enfermedad de Alzheimer, durante el envejecimiento no hay tal pérdida en el número de neuronas, por lo menos en lo que respecta a la neocorteza y al hipocampo (23,27). Sin embargo, es un hecho que las funciones mentales que dependen de la integridad funcional de los circuitos neocorticales e hipocámpicos sí se pierden con el envejecimiento. Entonces, nos preguntamos una vez más, ¿qué es lo que se deteriora en el cerebro senescente, si el número de neuronas permanece más o menos constante?

El envejecimiento normal se acompaña de un deterioro en los circuitos neocórtico-hipocámpicos que puede explicar el deterioro de la memoria

Nada es más terrible que olvidar; olvidar un poco, olvidar más, olvidarlo todo. La desesperación se toca: olvidar es no tener, no saber dónde escurrir las manos; perder apoyo en la tierra y en el espejo. ¿Quién es ése, o ésa que está ante nosotros? ¿Cuál es mi historia? ¿Quién: soy y quién he sido? Olvidar no sólo es no tener, es dejar de ser. Pero abandonemos estas reflexiones filosóficas, que por serlo no dejan de ser verdaderas, para volver a los datos "duros" de la ciencia. El circuito más vulnerable, tanto en el envejecimiento normal como en la neurodegeneración de Alzheimer, es la "vía perforante" que se origina en la lámina II de la corteza entorrinal y que termina en los dos tercios externos de la capa o estrato molecular que ocupan las dendritas de las células granulares de la fascia dentada. Esta es una conexión clave entre la neocorteza y el hipocampo. Es una región de convergencia de numerosas vías de la corteza asociativa que canaliza, hacia las células granulares de la fascia dentada, un flujo importante de información neocortical altamente procesada, que juega un papel central en la memoria (figs. 2 y 3).

Este circuito se encuentra invariablemente dañado en la enfermedad de Alzheimer por la formación de las famosas marañas u ovillos neurofibrilares, incluso en las etapas tempranas de esta enfermedad. La lámina II de la corteza entorrinal es la más afectada por la presencia de estos ovillos neurofibrilares. Más aún, inclu-

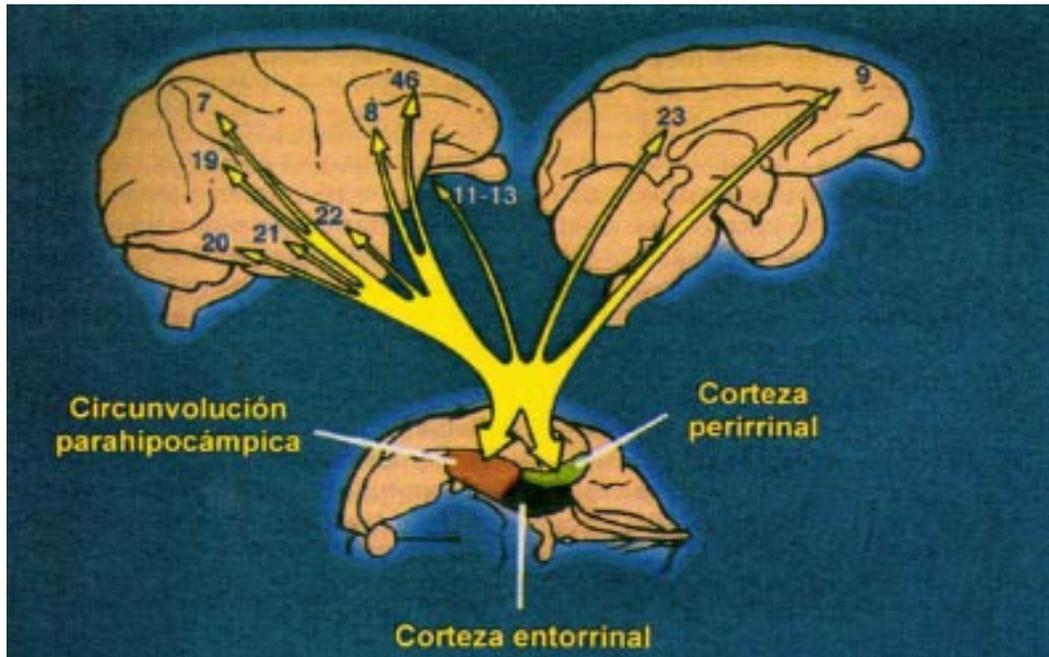


Figura 2. Conexiones de la circunvolución parahipocámpica, la corteza perirrinal (áreas 35 y 36) y la corteza entorrinal con otras áreas corticales. El diagrama muestra la convergencia masiva de diversas áreas corticales sobre el lóbulo temporal medial (flechas amarillas gruesas), el cual recibe de la mayoría de las regiones de la neocorteza un gran número de aferentes topográficamente ordenadas, y a su vez envía (flechas amarillas delgadas) proyecciones hacia áreas de asociación neocorticales (Adaptado de la referencia 23).

so en adultos mayores de 55 años, durante el envejecimiento normal hay algunas marañas neurofibrilares en esta capa cortical. Sin embargo, estos individuos no siempre sufren de una pérdida de memoria obvia y, definitivamente, a diferencia de la enfermedad de Alzheimer, no hay pérdida en el número de neuronas. En conclusión, es improbable que la pérdida de memoria que acompaña al envejecimiento normal resulte de la escasa presencia de ovillos neurofibrilares en la corteza entorrinal o de la pérdida en el número de neuronas (fig. 4).

Entonces, ¿qué es lo que se deteriora en este circuito neocórtico-hipocámpico? Geinisman y colaboradores (10) han encontrado una pérdida significativa del número de sinapsis en la vía perforante que terminan en las dendritas de las células granulares de la fascia dentada de ratas seniles, que podría explicar los déficits funcionales de este circuito, aunque este no parece ser el caso en los primates. También se han encontrado, tanto en roedores como en el hombre, cambios en el árbol dendrítico, en las espinas dendríticas y en la morfología de las sinapsis del hipocampo que podrían tener un impacto significativo en la función de este circuito sin necesidad de invocar el argumento de la muerte neuronal. Más aún, en la corteza prefrontal de monos, se ha demostrado que no hay pérdida de neuronas pero sí alteraciones en la vaina de mielina, sugiriendo que las conexiones de la corteza prefrontal permanecen íntegras pero funcionalmente deterioradas (23).

En los roedores, se han estudiado cambios funcionales que acompañan al envejecimiento en algunos circuitos involucrados en el almacenamiento y procesamiento de memorias tales como los hipocámpicos.

Se ha encontrado, particularmente en la fascia dentada, que el fenómeno de potenciación de larga duración descubierto por Bliss y Lømo (4), se haya afectado durante el envejecimiento (*vide infra*). Otros estudios llevados a cabo por Barnes y sus colaboradores (2) han utilizado el registro electrofisiológico de la actividad unitaria de las neuronas que codifican el espacio, las llamadas neuronas de lugar o "place cells". Estas neuronas se encuentran en la región CA1 del hipocampo y mantienen un mapa cerebral de la posición que el animal (rata) ocupa en el espacio. Las "células de lugar" en los animales envejecidos funcionan normalmente en un laberinto familiar para el animal, pero éstos no pueden rehacer el mismo mapa funcional cuando el laberinto no les es familiar, lo cual hace que entren en un estado de desorientación espacial. Si algo similar sucede en el cerebro humano, esto explicaría la historia que uno escucha frecuentemente de los ancianos que han sufrido una pérdida de memoria, salen de su casa a dar un paseo y no pueden regresar a ella pues han perdido "las coordenadas". Estas "coordenadas" son precisamente el mapa mental del espacio.

Durante el envejecimiento normal se pierden receptores al glutamato

Otro hallazgo fundamental que explica el deterioro de la memoria durante el envejecimiento normal es la pérdida del número de receptores al glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central. En la vía perforante, las sinapsis implicadas en el procesamiento de memorias, secretan glutamato, el cual interactúa con receptores específicos del tipo

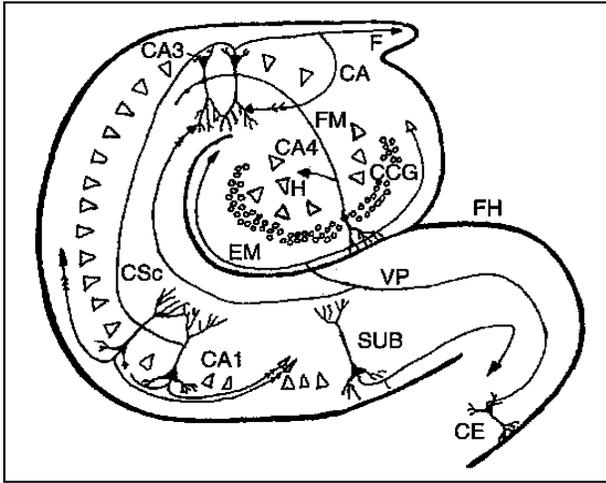


Figura 3. Esquema que muestra las conexiones internas del hipocampo y de la corteza entorrinal. Nótese el circuito trisináptico que se establece entre los siguientes elementos: 1) las células piramidales de la lámina II de la corteza entorrinal (CE), cuyos axones forman la vía perforante de Cajal (VP), que termina en los dos tercios externos del estrato molecular (EM) de la fascia dentada, que está constituido principalmente por las dendritas de las células granulares, cuyos cuerpos celulares yacen en la capa granular (CCG). 2) los axones de las células granulares, que en su conjunto forman las "fibras musgosas" (FM), que hacen contactos sinápticos con las dendritas proximales de las células piramidales del área CA4, que se encuentran localizadas en el *hilus* (H) de la fascia dentada y con las dendritas proximales de las células piramidales del área CA3. 3) Las pirámides de CA3, a su vez, envían colaterales a la fimbria (F) y a las pirámides de CA1. Estas últimas son las llamadas colaterales de Schaffer (CSc). También se muestran las fibras eferentes que forman la fimbria (F), las fibras de asociación (CA) y las proyecciones eferentes del subiculum (SUB) a las capas profundas de la corteza entorrinal (CE). FH denota la fisura hipocámpica.

NMDA. El funcionamiento de esta vía glutamatérgica, es esencial tanto para el procesamiento de memorias como para producir el ya mencionado y bien conocido fenómeno de potenciación de larga duración, que se considera como la expresión electrofisiológica de procesos de memoria y aprendizaje (3,15). Los receptores al glutamato del tipo NMDA son proteínas localizadas en la membrana plasmática de ciertas neuronas, que actúan como detectores moleculares de coincidencia de la actividad presináptica y postsináptica que subyacen al fenómeno de potenciación de larga duración. Estos receptores solamente abren los canales iónicos que tienen acoplados, cuando hay simultaneidad entre dos eventos: la liberación del neurotransmisor (glutamato) de las terminales presinápticas y la despolarización de la membrana de la célula postsináptica. Dada esta condición de sincronía entre eventos pre- y postsinápticos, la apertura de los canales iónicos acoplados al receptor, permite el influjo de calcio iónico a la neurona postsináptica, el cual detona una cadena de eventos poco entendidos hasta el momento, que culminan ya sea con un aumento en la liberación de neurotransmisor del elemento presináptico o con un aumento en la respuesta postsináptica. El receptor del tipo NMDA constituye la base molecular del aprendizaje tipo Hebb, así llamado en honor del famoso psicólogo canadiense que en 1949 postuló la hipótesis de que

el aprendizaje está mediado por cambios en la eficacia sináptica cuando hay una conjunción temporal entre la activación del elemento presináptico y el postsináptico (13). En monos, se ha encontrado que durante el envejecimiento hay un claro decremento en el número de receptores del tipo NMDA, sin que otros tipos de receptores al glutamato tales como el de AMPA o el de cainato se encuentren afectados. Esta disminución de receptores es particularmente aparente en la capa molecular externa de la fascia dentada donde, como hemos visto, terminan las fibras que provienen de la corteza entorrinal. La disminución del número de receptores al glutamato no se acompaña de un decremento en el número de neuronas o de cambios degenerativos en la vía perforante, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer (9,23).

Formación de nuevas neuronas en el cerebro humano de adultos

El otro gran dogma de las neurociencias, recientemente derribado, sostenía no sólo que durante el envejecimiento normal hubiese muerte neuronal progresiva, sino que, en el cerebro adulto de los seres humanos, no hay neurogénesis, por lo que una vez que una célula nerviosa muere, ésta se pierde para siempre. Unas investigaciones recientemente realizadas por un grupo de neurobiólogos suecos y norteamericanos, encabezados respectivamente por Peter Eriksson del Hospital Universitario de Sahlgrenska, en Gotemburgo, y por Fred Gage, del Instituto Salk, en La Jolla, California, demuestran la indiscutible existencia de neurogénesis en el cerebro adulto de sujetos cuya edad media era de 64.4 ± 2.9 años (7,16). Este es un hallazgo doblemente significativo, porque muestra que la neurogénesis no sólo es posible en el cerebro de los adultos sino que lo es en el cerebro de los adultos seniles. La zona donde estos investigadores encontraron evidencia de neurogénesis fue la fascia dentada del hipocampo, que ya había sido identificada como neurogénica por otros investigadores, en otras especies, particularmente en las aves y en los roedores (1). Los estudios en humanos fueron realizados en cinco pacientes que sufrían de cáncer terminal, cuya edad oscilaba entre los 57 y los 72 años, que habían sido tratados con propósitos diagnósticos con un análogo de la timidina, la bromodeoxiuridina (BrdU), que marca el DNA de las células que se están dividiendo pero no se incorpora a las que ya están diferenciadas, que han cesado de dividirse. Es decir, estos estudios se basan en la suposición de que las células que se dividen en el cerebro adulto, deben ser células progenitoras neuronales. La BrdU se identificó por medio de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo marcado con fluoresceína. Para cerciorarse de que las células que tenían BrdU eran neuronas, se utilizaron marcadores específicos de éstas tales como la NeuN, la calbindina o la enolasa (NSE), a la vez que se usaron marcadores de astrogliá tales como el de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Los cortes se analizaron por medio de microscopía de fluorescencia confocal (fig. 5).

Las células progenitoras de los granos de la fascia dentada se encontraron en la zona limítrofe que forma

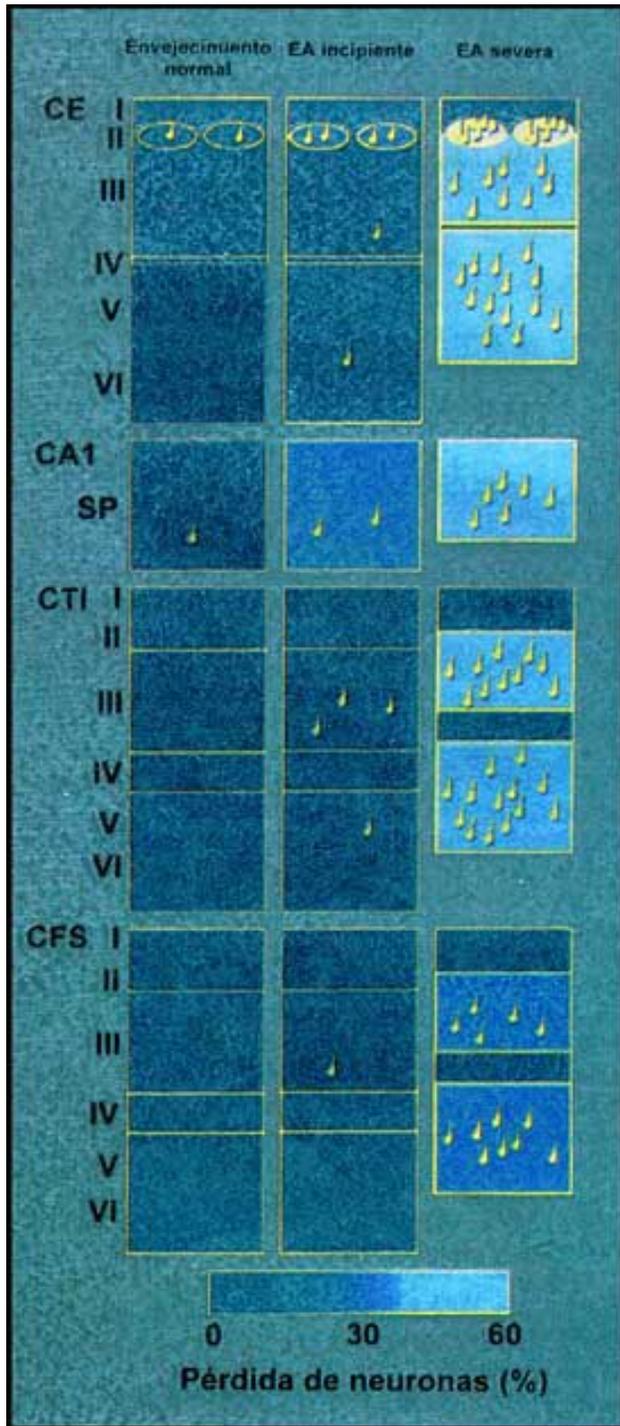


Figura 4. Diagrama que muestra de manera comparativa la densidad de ovillos neurofibrilares (representados por flamas amarillas) y el por ciento de pérdida de neuronas durante el envejecimiento normal y en la enfermedad de Alzheimer (EA) incipiente y severa. El porcentaje de pérdida de neuronas se representa con la escala que aparece en la parte inferior de la figura con diferentes tonos de azul, donde el tono más oscuro corresponde a la ausencia de pérdida neuronal y el más claro, al 60 % de esta pérdida. Cada cuadro representa las diferentes capas corticales (números romanos) de: la corteza entorrinal (CE), el estrato piramidal (SP) del área CA1 del hipocampo, la corteza temporal inferior (CTI) y la corteza frontal superior (CFS). En el envejecimiento normal no hay pérdida de neuronas, aunque consistentemente se encuentran unos cuantos ovillos neurofibrilares en la capa II de la CE y uno que otro en el SP del campo CA1 del hipocampo. En contraste, en la EA incipiente existe una pérdida neuronal significativa en la capa II de la CE y en el SP de CA1, aunque no la hay en la neocorteza. Además, el número de ovillos neurofibrilares aumenta de manera significativa en la CE y en el campo CA1, así como en la capa III de la CTI y en menor número en la CFS. El cuadro en la EA severa es muy distinto. Se encuentra un número significativo de ovillos neurofibrilares en la capa II de la CE, en el campo CA1 y en las capas II, V y VI de la CTI y un número moderado en la CFS. El grado de pérdida neuronal en estas áreas está correlacionado con el número de ovillos neurofibrilares, aunque este último *per se* no explica la pérdida neuronal total, lo cual indica que no todas las neuronas que mueren necesariamente forman ovillos neurofibrilares. El tamaño de los cuadros representa un cierto grado de enjambamiento cortical en la EA severa (adaptado de la referencia 23).

la capa de granos y el *hilus* (fig. 3). Estas células se dividen continuamente, migran hacia la capa de granos y se diferencian produciendo dendritas y axón característicos. El conjunto de estos últimos forma las fibras "musgosas" que contactan a las células piramidales, principalmente en la región CA3 (fig. 3). Estos datos prueban la existencia de neurogénesis en el cerebro humano de los adultos, aunque no prueban que las neuronas neoformadas sean funcionales, como reconocen cautelosamente los investigadores. Sin embargo, es-

tos estudios abren un rico y prometedor camino para realizar investigaciones en el campo de la regeneración y de la plasticidad neuronal. Más aún, permiten suponer que si fuese posible inducir la neurogénesis en regiones específicas del cerebro adulto, sería factible contrarrestar los efectos desbastadores de un gran número de enfermedades en las que hay daño o muerte neuronal, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, las embolias o los traumatismos, y desde luego, los procesos naturales de la se-

nescencia en los que aunque no parece haber muerte neuronal, sí hay un deterioro funcional cuyo sustrato probable ya hemos mencionado.

Para captar los alcances de estas investigaciones es necesario recordar las etapas de la neurogénesis así como los factores que la pueden alterar, sea incrementándola o inhibiéndola. Consta la neurogénesis de varias etapas que incluyen la proliferación de células progenitoras, la supervivencia de la progeñe, la migración y la diferenciación de las células post-mitóticas. La neurogénesis es un fenómeno maleable. Se sabe que los factores que afectan a una de estas etapas no necesariamente afectan a las otras. Por ejemplo, un aumento en la proliferación de las células progenitoras puede culminar en un aumento de nuevas neuronas si las tasas de supervivencia y diferenciación son constantes. Sin embargo, esto no sucederá si las tasas de supervivencia y diferenciación disminuyen. Análogamente, habrá un aumento en la formación de nuevas neuronas si las tasas de proliferación son constantes, pero las de supervivencia y diferenciación aumentan.

Se han descrito varios factores que afectan a la neurogénesis. Por ejemplo, Gould y sus colaboradores (11) encontraron que los neurotransmisores excitatorios que estimulan el disparo de potenciales de acción en las células granulares, inhiben la proliferación de las células progenitoras en el hipocampo. También encontraron que los niveles sanguíneos de glucocorticoides inhiben la neurogénesis en el adulto. Por ello, no es sorprendente que el mismo grupo de Gould haya descubierto que el estrés reduce la proliferación de células progenitoras en el hipocampo. El estrés, a su vez, produce la liberación de transmisores excitatorios y la secreción de glucocorticoides en las glándulas suprarrenales.

Por otro lado, entre los factores que promueven la neurogénesis en el hipocampo del cerebro adulto, se encuentra el aprendizaje. En efecto, también Gould y sus colaboradores (12) han probado que los animales

(ratas) sometidos a ciertos esquemas de condicionamiento, muestran un aumento significativo en el número de nuevas neuronas a expensas de un incremento en la supervivencia de las células hijas generadas por células progenitoras. También se han encontrado una serie de moléculas que promueven la neurogénesis en el adulto, tales como el factor de crecimiento epidérmico o el factor de crecimiento fibroblástico. Cuando estos factores se inyectan en los ventrículos laterales de ratas adulto, el primero de ellos favorece la diferenciación de las células progenitoras hacia un fenotipo glial en el bulbo olfatorio, mientras que el segundo promueve la formación de neuronas (16).

Las implicaciones de los datos discutidos aquí, son obvias. El estudio de los factores que afectan a la neurogénesis en el adulto nos permitirá, en el futuro no remoto, controlar dicho proceso y así poder diseñar estrategias que permitan la reparación de daño neuronal, cualesquiera que sea su origen.

Envejecimiento y muerte celular: Los telómeros, reloj de la vida celular

Las células humanas normales, excepción hecha de las germinales de los ovarios y de los testículos, se dividen un número determinado de veces; agotado este número, dejan de replicarse, envejecen y mueren por apoptosis. En otras palabras, las células somáticas normales tienen un reloj biológico en el que tarde o temprano se activa un programa genético de muerte celular. Evidentemente la duración de la vida de las células, como la de los individuos que forman, también está determinada biológicamente. ¿Qué determina el límite de longevidad de una célula? ¿Cuál es el reloj biológico que marca el principio y el fin de la vida de las células? ¿Es posible generar células inmortales?

El envejecimiento celular está determinado por el número de veces que una célula se divide y no por su

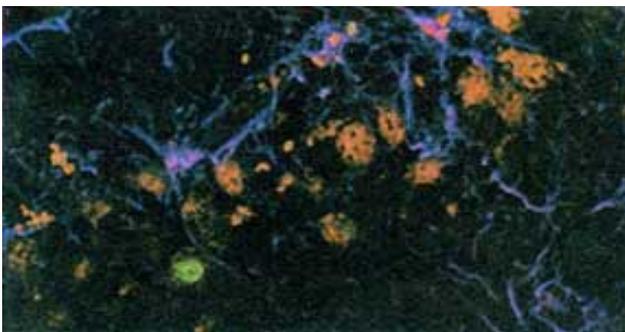


Figura 5. Prueba de la existencia de neurogénesis (formación de nuevas neuronas) en el cerebro de un humano adulto. Las dos micrografías corresponden a cortes histológicos a través de la capa granular de la fascia dentada en los cuales las neuronas aparecen en color rojo. Las nuevas neuronas aparecen marcadas en verde (izquierda) y en azul oscuro (derecha). La foto de la izquierda es una inmunofluorescencia doble. El marcador neuronal es NeuN, identificado a su vez con un anticuerpo secundario fluorescente (Cy3), que se ve de color rojo. Además el tejido fue tratado con un anticuerpo dirigido contra la bromodeoxiuridina (BrdU), cuya presencia fue detectada con un segundo anticuerpo conjugado con fluoresceína, que se ve de color verde. Por lo tanto, la neurona marcada en verde es de nueva formación ya que su DNA ha incorporado a la BrdU. En la foto de la derecha tomada en "campo claro" los cuerpos neuronales se marcaron también con NeuN, pero ahora éste se identificó con peroxidasa avidina-biotina y un cromógeno rojo. Mientras que la presencia de BrdU, que identifica a las neuronas de neoformación, fue detectada con un cromógeno azul. Los detalles técnicos se describen en la referencia 7. Las microfotografías fueron reproducidas de la referencia 16.

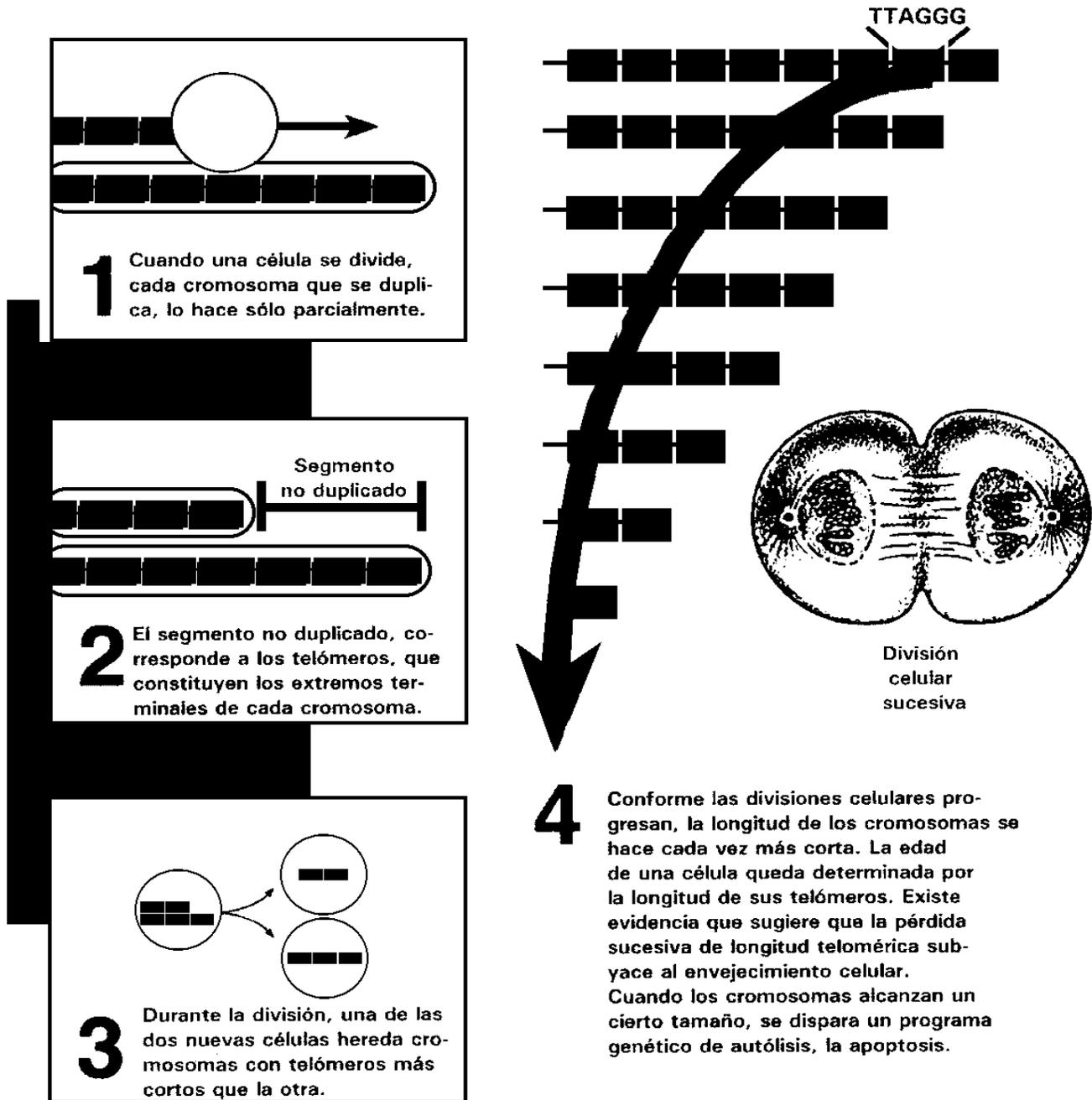


Figura 6. Esquema que ilustra el fenómeno de envejecimiento celular por divisiones sucesivas o "envejecimiento replicativo".

edad cronológica o metabólica, por lo cual se ha sugerido la existencia de un "reloj mitótico", que limita la proliferación celular (17). Resulta muy interesante el hecho de que las células cancerígenas, a diferencia de las normales, se dividan indefinidamente. ¿Qué tienen o que les falta a las células cancerígenas que les confiere "inmortalidad", a diferencia de las células somáticas normales, que dejan de dividirse, envejecen y mueren? Parece ser que la diferencia es la expresión de una enzima en las células tumorales llamada telomerasa (*vide infra*), que permite a las células dividirse un número

mero indefinido de veces, lo cual las hace virtualmente inmortales. ¿Qué es y cómo funciona la telomerasa?

Se ha sugerido que el reloj molecular del envejecimiento se encuentra en los telómeros (5,17), que son segmentos constituidos por secuencias repetidas de nucleótidos, localizados en los extremos terminales de los cromosomas, que sirven para cerrarlos y protegerlos. En los vertebrados, los telómeros consisten de cientos a miles de segmentos homólogos, constituidos por la secuencia de bases TTAGGG. Cuando una célula se divide, sus cromosomas se duplican con excepción

de parte de la punta de los mismos. Cada vez que una célula se divide, los cromosomas pierden alrededor de 50 a 200 nucleótidos de la secuencia telomérica. Es decir, cada vez que una célula se divide, sus cromosomas se acortan a expensas de los telómeros. Cuando los primeros alcanzan una longitud determinada, se dispara un programa de muerte celular: la apoptosis (fig. 6). Por ello se ha sugerido que el acortamiento de los telómeros constituye la señal que dispara el fenómeno conocido como "envejecimiento replicativo", es decir, el proceso mediante el cual las células envejecen conforme se van dividiendo (17). En apoyo a esta hipótesis se sabe que existen algunas entidades nosológicas caracterizadas por envejecimiento prematuro, como el síndrome de Down o Trisomía 21, en el que la pérdida de secuencias teloméricas está acelerada (29).

Otro hecho significativo relacionado con los telómeros es que las células tumorales también van perdiendo las secuencias teloméricas pero en algún momento "despiertan" la expresión de un gen, que está inhibido en las células normales, y que codifica para una enzima: la telomerasa. La extraordinaria función de esta enzima es sintetizar las secuencias teloméricas de nucleótidos, de tal manera que repara o restituye las secuencias perdidas en cada división y las células tumorales se transforman así en células inmortales (17). La telomerasa es una ribonucleoproteína que sintetiza al DNA telomérico de los extremos terminales de los cromosomas, usando un segmento de su RNA como "plantilla". La telomerasa no sólo se expresa en las células tumorales malignas, sino que se encuentra también activa en las células germinales y en las progenitoras. En suma, la longitud de los telómeros depende de la telomerasa, que se encarga de reparar los "errores" de copia en cada replicación. Las células que naturalmente expresan esta enzima, como las germinales, no presentan acortamiento de sus telómeros en el transcurso de sus múltiples divisiones. Pero en la mayoría de las células normales del organismo, el gen que expresa a la telomerasa se encuentra reprimido, mientras que en las células cancerosas el gen de la telomerasa se reactiva. Por estas razones, la telomerasa se ha convertido en centro de atención de dos problemas fundamentales de la biología, que se encuentran sorprendentemente relacionados: el cáncer y el envejecimiento. En apoyo a este punto de vista, hasta la fecha no se ha encontrado acortamiento de los telómeros en las células inmortales, lo cual sugiere que el mantenimiento de los telómeros por la telomerasa es clave para que las células no sufran el proceso de envejecimiento replicativo (*vide supra*) y proliferen de manera indefinida inmortalizándose (17). Se ha sugerido que en especies longevas, como los humanos, la represión de la expresión del gen de la telomerasa, vista desde una perspectiva evolutiva eminentemente fina-

lista, podría tener un papel protector del individuo, disminuyendo la probabilidad de que éste desarrolle cáncer. Si esta hipótesis es correcta, las especies de animales mamíferos caracterizadas por una longevidad corta, deberían expresar una represión más tenue de la enzima en sus tejidos somáticos y deberían mostrar una frecuencia mayor de transformaciones malignas espontáneas, así como una mayor incidencia de cáncer por año de vida. Hasta el momento esta hipótesis no ha sido puesta a prueba.

Más interesante aún es la pregunta de si es posible prevenir el envejecimiento celular sin malignizar a las células. Recientemente, el grupo que dirigen Jerry Shay y Woodring Wright, de la Universidad del Sudoeste de Texas, han logrado el hecho insólito de extender la longevidad de células humanas normales transfectándolas con vectores que codifican para la subunidad catalítica de la telomerasa humana (5). Faltaba por aclarar si estas células inmortales eran sanas. Si así fuera ¿estaría la clave del envejecimiento en este reloj celular? Otras investigaciones recientes realizadas en fibroblastos humanos en cultivo, que fueron transfectados con el gen de la telomerasa humana, muestran que las células así tratadas se mantuvieron por el doble del tiempo en el cual las células normales en cultivo envejecen y mueren (22). Estas células inmortalizadas no mostraron ninguno de los signos característicos de las células tumorales (véase también la referencia 14), lo cual hace factible el que, sin riesgo de malignización, la telomerasa pueda utilizarse como agente terapéutico en aquellas enfermedades que presentan envejecimiento prematuro, como el síndrome de Down o el síndrome de Werner.

En conclusión, por ahora se ha visto que la telomerasa es clave para el proceso de envejecimiento, pero sólo en células. Otra cosa es que lo sea para todo el organismo. Sin embargo, está claro que estamos viviendo un momento apasionante en la neurobiología y en la genética molecular en el que se han hecho logros que antes existían sólo en el terreno de los mitos y otras fantasías. Estos avances nos están permitiendo conocer los factores que determinan el envejecimiento. No es improbable que en un futuro no muy lejano, la biología molecular y el mejoramiento de las condiciones de salud, hagan realidad parte del anhelo de Don Juan Ponce de León, y los humanos podamos extender nuestra esperanza de vida y el límite biológico de nuestra a longevidad.

Agradecimientos

Se agradece la asistencia técnica del ingeniero José Rodolfo Fernández y del fotógrafo Raúl Cardoso G. en la preparación de las ilustraciones. Las investigaciones del doctor F.J. Alvarez-Leefmans están subvencionadas en parte por un donativo del "National Institute of Neurological Disorders and Stroke", número NS-29227.

REFERENCIAS

1. ALVAREZ-BUYLLA A, LOIS C: Mecanismos de desarrollo y plasticidad del sistema nervioso central. En: De la Fuente R, Alvarez-Leefmans FJ (eds.) *Biología de la Mente*. Fondo de Cultura Económica y El Colegio Nacional. México, 105-146, 1998.
2. BARNES CA, SUSTER MS, SHEN J, MCNAUGHTON BJ: Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. *Nature*, 388:272-274, 1997.
3. BLISS TV, COLLINGRIDGE GL: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361:31-39, 1993.
4. BLISS TV, LØMO TJ: Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232:331-356, 1973.
5. BODNAR AG, OUELLETTE M, FROLKIS M, HOLT SE, CHIU C-P, MORIN GB, HARLEY CB, SHAY JW, LIGHTSTEINER S, WRIGHT WE: Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279:349-352, 1998.
6. COLEMAN S, FLOOD D: Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 8: 521-570, 1987.
7. ERIKSSON PS, PERFILEIEVA E, BJÖRK-ERIKSSON T, ALBORN A-M, NORDBORG C, PETERSON DA, GAGE FH: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4:1313-1317, 1998.
8. FINCH CE, TANZI RE: Genetics of aging. *Science*, 278:407-411, 1997.
9. GAZZALEY AH, SIEGEL SJ, KORDOWER JHA, MUFSON EJ, MORRISON JH: Circuit specific alterations of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in the dentate gyrus of aged monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:3121-3125, 1996.
10. GEINISMAN Y, DETOLEDO-MORRELL L, MORRELL F, HELLER RE: Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog Neurobiol*, 45:223-252, 1995.
11. GOULD E, WOOLLEY C, MCEWEN B: Short term glucocorticoid manipulations affect neuronal morphology and survival in the adult dentate gyrus. *Neuroscience*, 37:367-375, 1990.
12. GOULD E, BEYLIN A, TANAPAT P, REEVES A, SHORS TJ: Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 2:260-265, 1999.
13. HEBB DO: *The Organization of Behavior*. Wiley, Nueva York, 1949.
14. JIANG X-R, JIMENEZ G, CHANG E, FROLKIS M, KUSLER B, SAGE M, BEECHE M, BODNAR AG, WAHL GM, TLSTY TT, CHIU C-P: Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nature Genetics*, 21:111-114, 1999.
15. JOHNSTON D: A missing link? LTP and learning. *Science*, 278:401-402, 1997.
16. KEMPERMANN G, GAGE FH: New nerve cells for the adult brain. *Scientific American*, 280:38-43, 1999.
17. KIM NW, PIATYSZEK MA, PROWSE KR, HARLEY CB, WEST MD, HO PLC, COVIELLO GM, WRIGHT WE, WEINRICH SL, SHAY JW: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266:2011-2015, 1994.
18. KIRKWOOD TBL: Is there a biological limit to the human life span? En: Robine JM, Vaupel JW, Jeune B, Allard M (eds). *Longevity: To the Limits and Beyond*. Springer-Verlag, Berlin, 69-76, 1997.
19. MEDAWAR PB: Old age and natural death. *Modern Quarterly*, 1:30-56, 1946.
20. MEDAWAR PB: *An Unsolved Problem of Biology*. Lewis HK. Londres, 1952.
21. MEDINA J: *The Clock of Ages*. Cambridge University Press. Cambridge, 1996.
22. MORALES CP, HOLT SE, OUELLETTE M, KAUR KJ, YAN Y, WILSON KS, WHITE MA, WRIGHT WE, SHAY JW: Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature Genetics*, 21:115-118, 1999.
23. MORRISON JH, HOF PR: Life and death of neurons in the aging brain. *Science*, 278:412-419, 1997.
24. ORR W C, SOHAL RS: Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 263:1128-1130, 1994.
25. PAZ O: Los beneficios de la muerte. En: *Octavio Paz, Obras Completas*, 13:391-393. Fondo de Cultura Económica, México, 1999.
26. RAMON Y CAJAL S: *El Mundo Visto a los Ochenta Años*. Tipografía Artística, Madrid, 1934.
27. RAPP PR, GALLAGHER M: Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:9926-9930, 1996.
28. ROBINE JM, VAUPEL JW, JEUNE B, ALLARD M: *Longevity: To the Limits and Beyond*. Springer-Verlag, Berlín, 1997.
29. SALAMANCA-GOMEZ F: La telomerasa: inmortalizar sin malignizar. *Gac Méd Méx*, 135:203-204, 1999.
30. SAPOLSKY RM: *Stress, the Aging Brain, and the Mechanisms of Neuron Death*. The MIT Press. Cambridge, Mass, 1992.
31. WACHTER K W, FINCH C E: *Between Zeus and the Salmon. The Biodemography of Longevity*. National Academic Press, Washington, 1997.
32. VALLIN J, CASELLI G: Towards a new horizon in demographic trends: the combined effects of 150 years life expectancy and new fertility models. En: Robine JM, Vaupel JW, Jeune B, Allard M (eds). *Longevity: To the Limits and Beyond*. Springer-Verlag, Berlín, 29-68, 1997.
33. ZARIT SH: *Aging and Mental Disorders*. The Free Press. Macmillan Publishing, Nueva York, 1980.