

CAPÍTULO VI

Envejecimiento: ADN mitocondrial y nuclear

■ Elena Domínguez-Garrido¹ y Manuel J. López Pérez²

¹Unidad de Diagnóstico Molecular. CIBIR. Fundación Rioja Salud. Piqueras 98. 26006 Logroño. La Rioja, España.

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza, España. edicion@ranf.com

RESUMEN

La longevidad ha sido durante años el último deseo de la humanidad, por esta razón, la búsqueda del “elixir de la vida” ha atormentado al hombre durante siglos. Posteriormente, cuando los campos de la ciencia y la tecnología comenzaban a extenderse y los avances conseguidos mejoraron la calidad de vida, tanto en ricos como en pobres, la reducción de la mortalidad y morbilidad en ancianos y la presencia de “supercentenarios” llevaría a pensar que la esperanza de vida seguiría aumentando de manera gradual y lentamente. En el siglo XXI, el hombre ha dejado atrás la búsqueda de la inmortalidad y se ha centrado en conseguir una mayor supervivencia en las mejores condiciones físicas y mentales. Para ello se recurre a la genómica buscando el descubrimiento de los factores genéticos que afectan al mecanismo del envejecimiento y a enfermedades relacionadas con él. Aunque se conocen todavía poco sobre los diversos factores que afectan a la longevidad en los seres humanos, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos que evidencian la dependencia de la longevidad respecto al fondo genético.

INTRODUCCIÓN

El término gerontología fue introducido por Metchnikoff en 1903, para designar el estudio científico del proceso del envejecimiento en los seres vivos. Referido al ser humano, este término recoge aspectos sociológicos, psicológicos y económicos a los que ha de enfrentarse la sociedad actual. De esta manera, surge la Biogerontología con grupos de investigación en numerosos países.

La longevidad o ciclo vital puede definirse como la duración máxima posible específica de cada especie, que en el ser humano y por acuerdo científico, se cifra en 120 años. Mientras que la esperanza o expectativa de vida es el índice demográfico que expresa la media o promedio de años de vida que una persona puede vivir según su año de nacimiento. No debemos olvidar por tanto que estamos sometidos a un factor ambiental importante que condicionará nuestro envejecimiento (Figura 1).

En España, la mayoría de los recién nacidos celebrará su 65 cumpleaños. A principios del siglo XX sólo el 26% de la población llegaba a anciano; en las condiciones de mortalidad actuales, de 100 nacidos, 86 alcanzarán la vejez. La esperanza de vida ha crecido considerablemente, en 1900, se situaba en 34 y 36 años para hombres y mujeres, actualmente, una vez alcanzado el umbral de los 65 años, se sitúa en 81 y 85 años respectivamente (Abellán. 2003) (Figura 2).

España se sitúa entre los países europeos con mayor esperanza de vida de sus personas mayores. La OMS estima que en el año 2015 habrá en todo el mundo unos 300 millones de ancianas, lo que obligará a una cierta focalización y orientación de los servicios de geriatría hacia las enfermedades propias de la vejez, sobre todo para combatir la mortalidad general y mejorar las condiciones de vida de las ancianas.

El vertiginoso avance desarrollado en el conocimiento de la genética humana principalmente en el estudio de enfermedades hereditarias y la evolución del hombre, lleva a situar entre ambas áreas el estudio genético del envejecimiento y la longevidad dada la importante repercusión socioeconómica que está planteándose en los países desarrollados.

Sin embargo, los éxitos conseguidos en los estudios de enfermedades monogénicas (gen-causa), no se reflejan en los llevados a cabo en enfermedades poligénicas, en las cuales, existe una interrelación entre los loci para rasgos cuantitativos (QTL) de etiología heterogénea y los factores ambientales, como es el caso de la obesidad, hipertensión y, por

supuesto, la longevidad/envejecimiento. Con todo ello, han de desarrollarse estrategias que permitan aflorar mínimas variaciones genéticas causantes de los fenotipos cuantitativos.

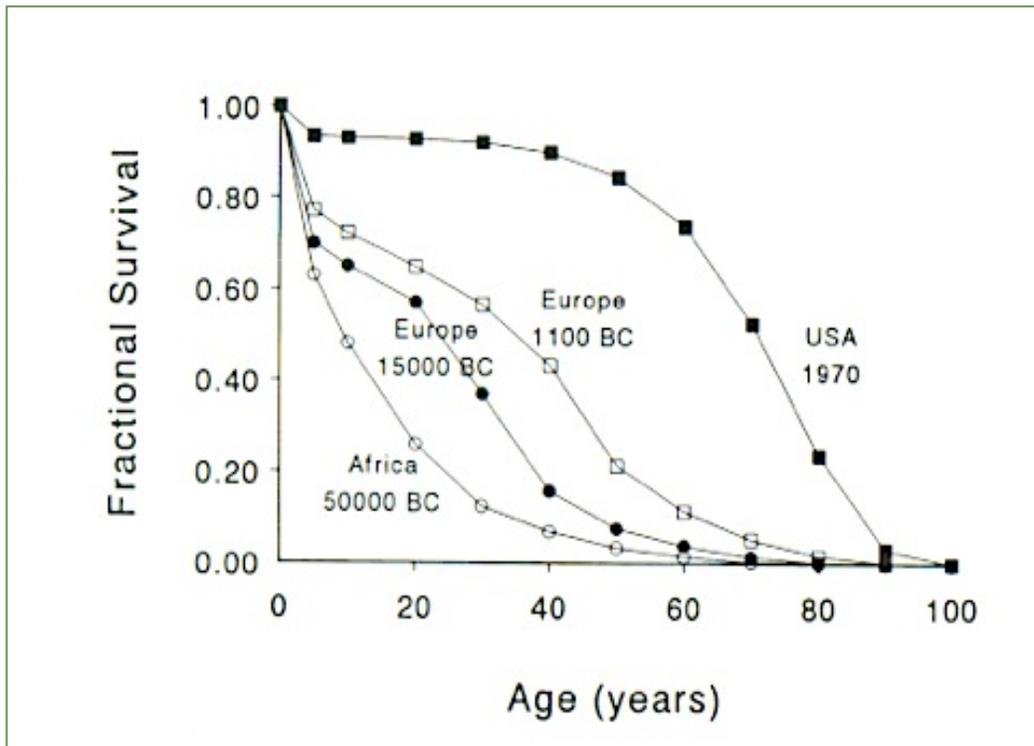


Figura 1.- Variación de la supervivencia media en los últimos 50.000 años. África, 50.000 años AC, 10-12 años; Europa, 15.000 años AC, 25 años; Europa, 1.100 años AC, 35 años; Estados Unidos, 1970, 65-70 años (Greger R. 1996).

En los últimos 30 años, el envejecimiento ha sido objeto de amplios estudios, fundamentalmente, centrados en las enfermedades relacionadas con la edad (Hayflick. 2000) mientras que los trabajos sobre longevidad surgen quizás en los últimos 10 años basados en los polimorfismos genéticos implicados, como el estudio llevado a cabo por Ljungquist et al. (1998) en gemelos de los países escandinavos.

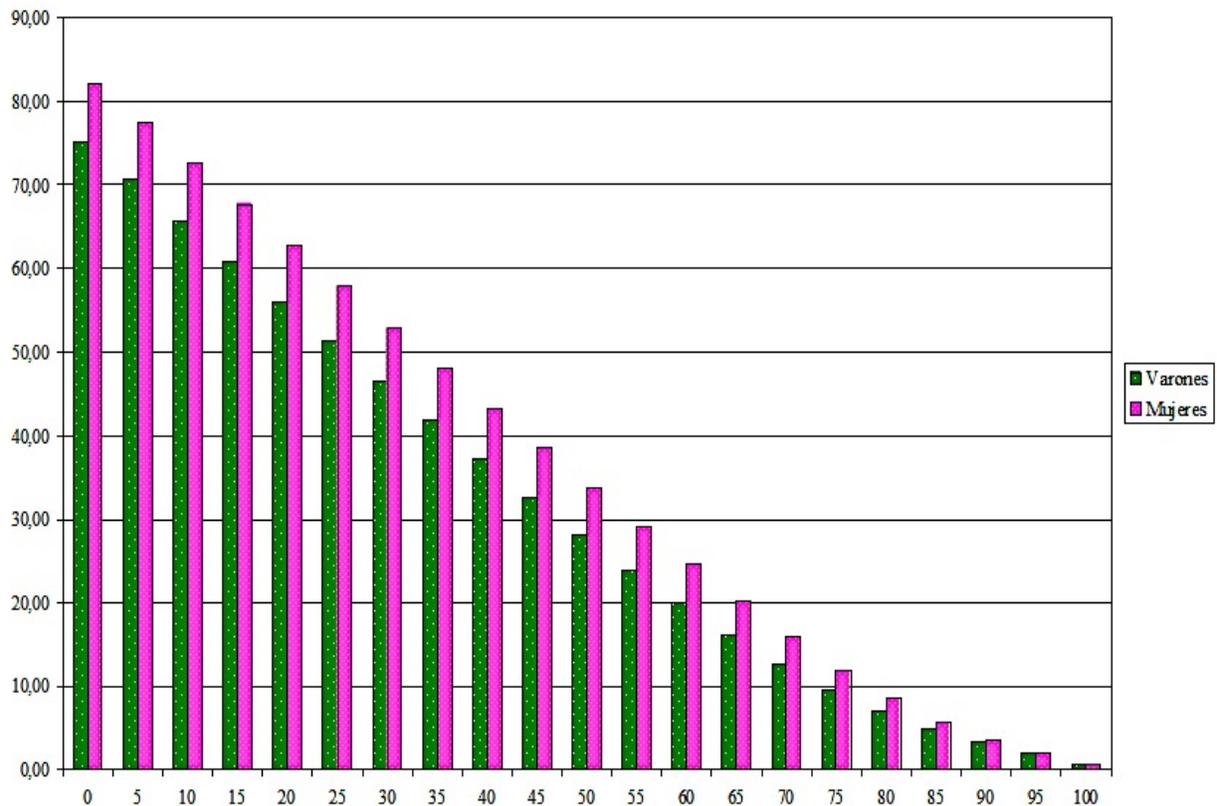


Figura 2.- Esperanza de vida al nacimiento en España de 1998-1999. (Martín Ruiz. INE, 2003).

El envejecimiento reproductivo

El envejecimiento reproductivo humano supone que, aunque la línea germinal es inmortal, se van acumulando lesiones sobre las células germinales con la edad. De esta manera, en el ovario las pérdidas foliculares se aceleran a partir de los 35 años y en el varón comienza el declive en torno a los 45 años. Pese a esto, los hijos sanos de parejas añosas no se hacen viejos prematuramente, aunque sí existe la idea de que la longevidad en las hijas se ve afectada adversamente por la avanzada edad paterna (Gavrilov et al. 1997).

Desde hace unos años atrás han apareciendo estudios epidemiológicos en los que se intuyen ligamientos entre la menopausia y la longevidad humana. En estos estudios se ha comprobado que las mujeres que tuvieron pocos hijos y especialmente con más de 50 años,

presentaban un incremento en la longevidad. Un potencial mediador sería el estrógeno y la persistencia de su efecto a lo largo de la actividad menstrual (Westendorp et al. 1998).

Por otro lado, los datos demográficos sugieren la existencia de distintas trayectorias a lo largo de la vida de las mujeres que marcan importantes diferencias en la incidencia y prevalencia de las enfermedades relacionadas con la edad. Franceschi et al. (2000) realizaron un amplio estudio en distintas poblaciones italianas en el que analizaban 1162 centenarios (222 naturales de Cerdeña, 43 de la provincia de Mantua y el resto de otras provincias italianas). La relación mujer/hombre en estas poblaciones fue: 2/1 en Cerdeña, 4/1 en el conjunto italiano y 7/1 en Mantua variaciones que suponen la compleja interacción del ambiente, los factores históricos y los factores genéticos. En este mismo estudio se observó que los hombres centenarios mantenían una mejor salud física y mental que las mujeres. Estos resultados parecen indicar que los factores de la longevidad femenina tienen menor dependencia genética que en los varones y que son las condiciones ambientales y un estilo de vida más sano, las más favorables para las mujeres.

Factores ambientales

Las modificaciones ambientales que por unanimidad se han determinado como las que inducen el incremento en la expectativa de vida en los animales, son:

- el descenso de la temperatura ambiental
- la reducción del estrés
- la restricción en la dieta sin malnutrición

En estos momentos, se están llevando a cabo diversos trabajos para profundizar en la base científica que explique los mecanismos fisiológicos comunes a estas circunstancias.

Estos estudios, se están centrando en la regulación de la temperatura corporal y el proceso de termorregulación que se produce tanto en las exposiciones al frío como al calor y está relacionado con distintas situaciones alimentarias, ejercicio físico, consumo de alcohol, etc. (Groot et al. 1999; Nicholls et al. 1984; Smith R.E. 1961).

El envejecimiento correlaciona positivamente con un aumento del estrés oxidativo, con el descenso de la actividad antioxidante y/o con el incremento de los factores pro-oxidantes. De esta forma, la longevidad humana extrema se asociaría a un grado bajo de estrés oxidativo y a la resistencia a la insulina (Barbieri et al. 2003, Park et al. 2011).

Existen evidencias derivadas de estudios en humanos en los que se describe que una restricción calórica en la dieta reduce las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, así como aumenta la esperanza de vida. Hendrie et al. (2001), encuentran que la incidencia de casos de Alzheimer está aumentada en individuos de zonas industrializadas donde la ingesta calórica es muy alta si se comparara con individuos de zonas rurales.

El hecho de que la restricción calórica en la dieta aumente la longevidad y reduzca el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, y cáncer hace suponer que los parámetros bioquímicos estén modificados y por tanto las funciones celulares. Un ejemplo es que esta restricción en la dieta puede estabilizar la función mitocondrial y reducir el estrés oxidativo celular (Morgan et al. 2000).

Factores genéticos

Los estudios en la longevidad humana han de centrarse en las poblaciones de edad avanzada, en las que sea posible demostrar las siguientes observaciones (Hitt et al. 1999; Rybicki et al. 2000):

- Que exista una probabilidad relativa de 4/7 entre hermanos de centenarios de alcanzar la misma edad. En las poblaciones en las que la probabilidad es de ocho veces la de los controles, necesariamente ha de existir un componente genético para esa longevidad excepcional.
- La proporción de individuos que alcanza la edad de 100 años es 1/5000-10000.
- Habitualmente, los centenarios mantienen buena salud hasta esas edades y una buena parte de ellos consume pocos medicamentos hasta la edad de los 70 años, aún cuando con frecuencia presentan hábitos poco saludables como son la obesidad y el tabaquismo, lo que sugiere una predisposición más bien genética que ambiental para la longevidad.
- Los centenarios tienen periodos de morbilidad más reducidos que los individuos que fallecen a edades más tempranas.

Para la realización de estudios en individuos centenarios de genes involucrados en longevidad, se requiere muestras numerosas que definan la relación genotipo/fenotipo, sin embargo, recoger este importante número de muestras lleva varios años siendo una tarea costosa.

Las poblaciones homogéneas presentan una ventaja y es que hay pocos genes candidatos para la longevidad, por lo que sería más fácil su identificación. Un par de puntos importantes, en los centenarios en análisis, que deben ser considerados son los biomarcadores y rasgos intermedios que revelen el estado clínico de envejecimiento.

La longevidad, como se ha mencionado anteriormente, se considera un rasgo complejo que se ve afectado por factores genéticos y ambientales con interrelación entre ellos. La primera confirmación de la influencia genética sobre la longevidad se realizó en individuos emparentados en una población danesa, donde la varianza genética referida a la duración de la vida se estimó en un 25% (Herkskind et al. 1996). De esta manera, quedaba demostrada la importancia que los genes tienen modulando la supervivencia individual. Simultáneamente se pudo confirmar que en la expectativa de vida no existía un efecto aditivo genético debida a la interacción de genes, tanto de un locus como de diferentes loci. Esta ausencia de efectos sumatorios es un mecanismo importante para mantener la supervivencia individual (Tan et al. 2002). El número de genes que podrían afectar a la variabilidad inter-individuos en la longevidad humana se espera que sea alto.

El análisis de genes nucleares probablemente, relacionados con longevidad ha generado resultados contradictorios que dificultan avanzar en la comprensión de este fenómeno. Algunos de estos genes se resumen a continuación:

El gen **ACE** (enzima conversora de la angiotensina-1). En varios estudios se considera el alelo D como un posible marcador genético en la longevidad, así como, la concentración de enzima como marcador fenotípico de ésta (Faure-Delanef et al. 1998).

Los genes **APOA1** (apolipoproteína A1), **APOA4** (apolipoproteína A4) y **APOC3** (apolipoproteína C3). Ampliamente estudiados con respecto a la alteración de las lipoproteínas y la patología cardiovascular. Un estudio realizado en individuos de 18 a 109 años mostró una variación significativa del gen APOA1 de tal manera que el alelo A descendía en individuos de 46 a 80 años mientras que el alelo P aumentaba en los varones de mayor edad. En los genes APOA4 y APOC3 no se observó ninguna diferencia alélica significativa (Garasto et al. 2003).

El gen **PI** (inhibidor de la proteasa). El genotipo M/M y M/S de este gen está relacionado con cifras de tensión sistólica mayores que los sujetos Z/Z, diferencia que a priori, supondría una selección positiva de la población. En el caso de estudios realizados a individuos longevos la aportación de prevalencia alélica del gen PI ha sido nula (Dahl et al. 2003).

Los genes **REN** (renina), **THO** (tirosina hidroxilasa), **PARP** (polimerasa poli-ADP-ribosa) y **SOD2** (superóxido dismutasa 2). Del estudio derivado en poblaciones italianas con tres o más generaciones y teniendo en cuenta los cambios migratorios sufridos en esta población, el único gen que mostró una segregación discordante fue el gen THO. El análisis genotipo/sexo/zona geográfica, dentro de las muestras seleccionadas como longevidad y controles, demostraron la pérdida del genotipo L/L en longevos, indicando que dichos alelos serían desfavorables únicamente o preferentemente en varones (De Benedictis et al. 1998).

El gen **IL-10** (interleuquina 10). El genotipo -1082 G/G se halla aumentado en centenarios varones, lo que parece indicar que los hombres y mujeres siguen estrategias distintas para alcanzar la longevidad (Pinderski- Oslund et al. 1999).

El gen **IGF-1** (factor de crecimiento de insulina 1), **PI3KCB** (fosfoinositol – 3 – quinasa), **IRS-1** (sustrato 1 del receptor de la insulina). Los niveles de IGF-1 libre y múltiples variantes polimórficas han sido analizadas conjuntamente, resultando como el primer indicio de que los niveles plasmáticos de IGF-1 libre y la longevidad están corregulados por este grupo de genes, propiedad que se ha conservado en la evolución del reino animal (Bonafè et al. 2003).

El gen **APOE** (apolipoproteína E). Diferentes estudios han demostrado una acción débil en la selección de poblaciones longevas, de tal manera, que el alelo e2 podría influir en beneficio de los varones (Gerdes et al. 2000).

El gen **PON1** (paraoxonasa 1). La frecuencia del alelo 192R se ve incrementado de jóvenes a centenarios lo que indicaría que podría hacer descender la mortalidad en los portadores (Bonafè et al. 2002).

Por otro lado, otro factor a tener en cuenta en el proceso de envejecimiento son los telómeros encargados de mantener la estabilidad cromosómica y cuyo acortamiento lleva al envejecimiento (Cawthon et al. 2003; Cherif et al. 2003, Bischoff et al. 2006;).

Además del estudio de los genes nucleares y los telómeros, diversos autores han investigado la interrelación del mtDNA / mitocondria y la longevidad, dada la gran importancia que la producción de energía tiene en el proceso de envejecimiento (Abbot et al. 1987; De Benedictis et al. 1999; Niemi et al. 2003; Tanawa et al. 2000; Wallace et al. 1999). Los resultados de estos trabajos concluyen que el fondo genético mitocondrial influye claramente en la longevidad, apareciendo ciertas variantes mitocondriales mayoritariamente en individuos longevos.

En la Figura 3 se resumen los factores que llevan al envejecimiento. DNA telomérico, nuclear y mitocondrial y el estrés oxidativo endógeno que actúa sobre ellos, provoca: **Daño celular**, que termina en **Envejecimiento**.

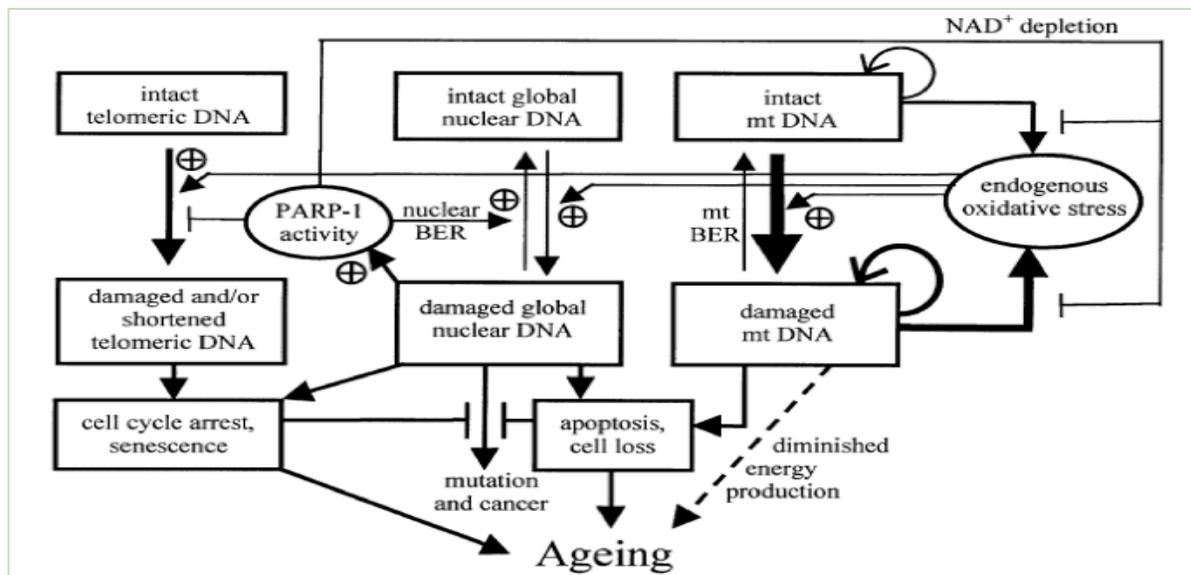


Figura 3.- Diagrama esquemático de la generación de las principales especies reactivas en la mitocondria y su diana de actuación. (Kirkinezos and Moraes 2001).

Radicales libres (ROS)

En el sistema de fosforilación oxidativa de la mitocondria, se consume entre el 85-90% del oxígeno utilizado por la célula (Chance et al. 1979; Shigenaga et al. 1994), actuando como aceptor final de electrones. De este oxígeno, entre un 1 y un 3% sufre una reducción, dando lugar al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que a su vez es reducido por acción de la superóxido dismutasa generando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Boveris et al. 1973; Nohl et al. 1978; Freeman et al. 1982) (Figura 4).

Son muchas las situaciones donde se ha relacionado el aumento de ROS con las alteraciones mitocondriales. Se sabe que el estrés oxidativo juega un papel importante en enfermedades neurodegenerativas como son el Parkinson, Alzheimer, corea de Huntington

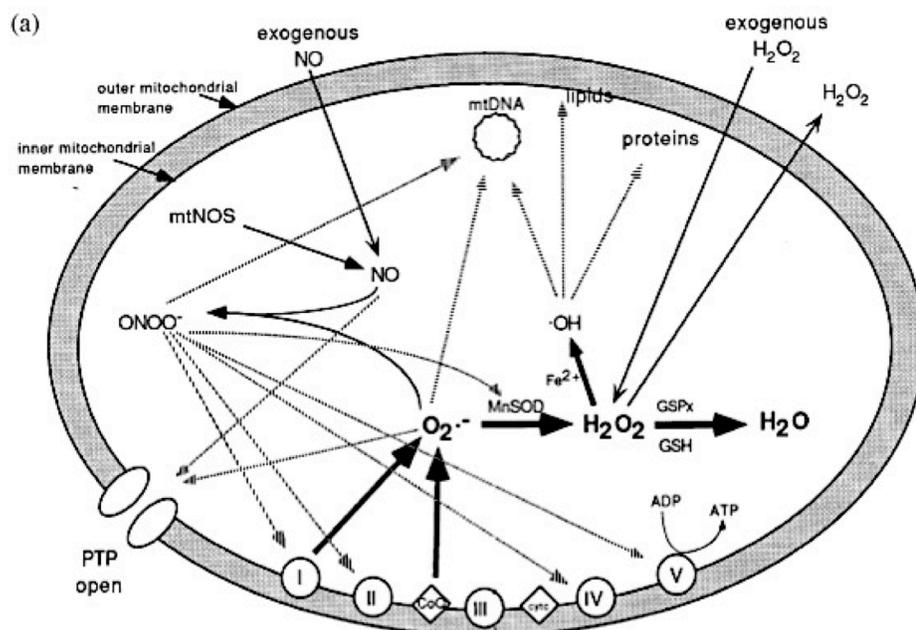


Figura 4.- Diagrama esquemático de la generación de las principales especies reactivas en la mitocondria y su diana de actuación. (Kirkinezos and Moraes 2001).

y en estas, se ha observado cómo está dañado el mtDNA (Browne et al. 1997). Además, muchos estudios han demostrado que las mutaciones en el mtDNA se asocian a fallos en la OXPHOS, aumentando la producción de ROS y el daño oxidativo. En este caso, se describe que si una mutación conlleva un aumento en la producción de ROS, éste va a promover

segundas mutaciones en el mtDNA dada la baja capacidad de reparación existente en el mtDNA (Wei et al. 1998).

En el caso del envejecimiento, se ha visto que el mtDNA expuesto a ROS, acumula mutaciones con la edad, sobre todo en la zona no codificante (Michikawa et al. 1999; 2002). Además también se ha observado en ancianos un aumento de la oxidación de los lípidos y de las proteínas mitocondriales.

Las fuertes transiciones del mtDNA entre poblaciones africanas y euroasiáticas indican que la diversificación del mtDNA ha estado sometido a una selección climática. Las mitocondrias producen ATP y a su vez, generan calor para mantener la temperatura corporal. El equilibrio entre ambos procesos viene determinado por la efectividad del sistema OXPHOS que en gran medida está regulado por la ATP sintetasa.

Una OXPHOS menos eficiente genera más calor para una misma cantidad de ATP, de esta manera, en los trópicos sería una ventaja tener una OXPHOS muy eficiente y en el Ártico podría ser imprescindible para la supervivencia una menos eficaz. En consecuencia, la reducción de la actividad del sistema OXPHOS generaría menor equivalentes reductores de la dieta lo que induce la producción de ROS.

La reducción de ROS durante la vida de un individuo supone un descenso de la apoptosis y paralelamente el aumento en los años de vida. Se ha observado que el haplogrupo J y la variante C150T altera la eficiencia del sistema OXPHOS y la producción de ROS de forma que se reduce el estrés oxidativo y se incrementa la longevidad (Coskun et al. 2003; Klein et al. 2003; Ruiz-Pesini et al. 2004).

Filogenia mtDNA

Múltiples estudios sobre la variabilidad genética del mtDNA han demostrado que existe una correlación entre el origen étnico y geográfico de los individuos. En 1995, Chen et al. presentaron el estudio de los RFLPs por digestión del mtDNA con la enzima de restricción HpaI de los distintos continentes. Este estudio revelaba que el polimorfismo C3594T era muy frecuente en los africanos, entorno al 75% de las muestras subsaharianas, y no se encontraba en europeos y asiáticos (Wallace et al. 1994-1995-1999).

La ruta de migración para la salida de África del humano anatómicamente moderno se produjo por el este africano hacia la India occidental, siendo, probablemente, el único

evento de dispersión temprana exitosa de los humanos modernos fuera de África (Quintana-Murci et al. 1999) (Figura 5).

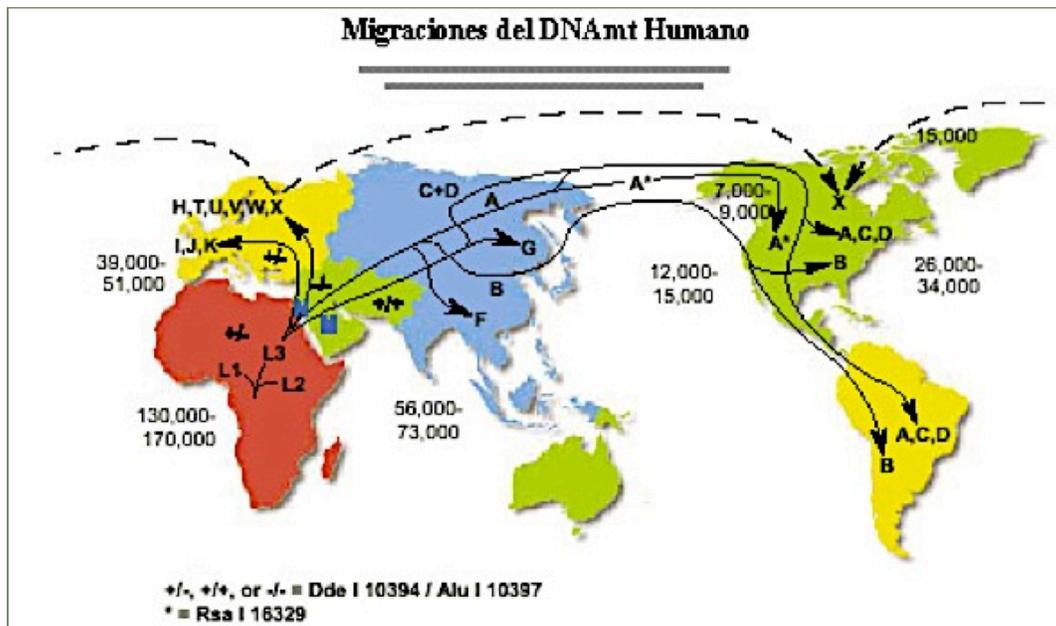


Figura 5.- Migración del hombre moderno desde África al resto de continentes. (Mitomap, 2005).

Haplogrupos mtDNA

El primer estudio dirigido a la identificación de los haplogrupos, se realizó en individuos con ancestros europeos que vivían en Estados Unidos y Canadá mediante RFLPs, revelando la existencia de 4 haplogrupos mitocondriales; H, I, J y K, específicos de europeos que abarcaban el 64% de los sujetos analizados (Torroni et al. 1994).

Posteriormente el estudio fue realizado en tres poblaciones europeas, representativas de la diferenciación lingüística y genética (finlandesa, sueca y toscana), mostrando cinco nuevos haplogrupos mitocondriales: V, W, X, T y U, además de los cuatro anteriores. Este hallazgo sugiere que los nueve haplogrupos mitocondriales junto con el superhaplogrupo africano y asiático L y M respectivamente pueden abarcar casi todo los mtDNAs de Euroasia occidental (Torroni et al 1996-2000).

Mediante la secuenciación de la región hipervariable I y II (Macaulay, 1999) la amplificación de todo el mtDNA en fragmentos solapantes y su digestión mediante un amplio número de enzimas de restricción (Torroni et al. 1992), así como la búsqueda de determinados polimorfismos y mutaciones específicas de haplogrupos particulares (Hofmann et al. 1997b) puede clasificar a los individuos en los distintos haplogrupos mitocondriales.

mtDNA y longevidad

La longevidad es un proceso complejo multifactorial que ahora estamos empezando a entender. Varios estudios sugieren que la mitocondria juega un papel importante en este proceso.

Uno de los primeros trabajos relacionados con este tema fue el realizado sobre la longevidad/enfermedad coronaria de Framingham. Este estudio indicaba que la longevidad está más fuertemente asociada con edad de muerte materna que paterna, sugiriendo que la herencia de mtDNA debiera estar implicada en este proceso (Brand et al. 1992).

Tanaka et al. (1998), observó que el polimorfismo mitocondrial C5178A era significativamente mayor en centenarios japoneses comparados con un grupo control de edad < 46 años. Este polimorfismo define al haplogrupo M frecuente en población asiática y poco detectado en población europea. Posteriormente Tanaka et al. (2000) postula que el genotipo 5178A disminuye la acumulación de mutaciones en el mtDNA de células somáticas efecto que causa un aumento de la edad, así como, confiere una resistencia a padecer enfermedades propias de la edad, suprimiendo la obesidad y la aterosclerosis (Castrì et al. 2009).

Estudios posteriores en población europea, mostraban una clara relación de la longevidad con ciertos haplogrupos mitocondriales, en particular con el haplogrupo J, lo que llevaba a postular que este haplogrupo podría proporcionar una mayor resistencia a los efectos deletéreos de la acumulación de mutaciones en el mtDNA que aparecen con la edad (Ivanova et al. 1998; De Benedictis et al. 1999).

Los estudios de haplogrupos mitocondriales y longevidad aunque se han ido sucediendo en el tiempo no han sido muy numerosos. En un estudio realizado por Ross et al. (2001) en población nonagenaria irlandesa observaron que no existían diferencias significativas para el haplogrupo J en esta población aunque sí las encontraban para dos haplotipos comprendidos en la primera rama del haplogrupo J, el 16000G y el 16389G. En

el caso del polimorfismo 16389G ha sido descrita como la mutación que define el subhaplogrupo L2 dentro del haplogrupo L africano (Chen et al. 1995). Estos estudios corroboran la teoría de que el genoma mitocondrial juega un papel importante en el proceso del envejecimiento.

Para comprender mejor como el haplogrupo J podría estar asociado a longevidad, Rose et al. (2001), secuenciaron la región del D-loop mitocondrial en muestras de controles y centenarios. En el análisis del D-loop encuentran que las muestras de centenarios son más diversas que los controles, excluyendo la posibilidad de variabilidad en el muestreo puesto que todas las muestras correspondían a una misma zona geográfica. Además encuentran que la mutación 3010A, correspondiente al subhaplogrupo J1, era significativamente mayor en el grupo de centenarios, como ocurría en el estudio en población japonesa (Tanaka et al. 1998). Esta mutación aparece en pacientes con patología mitocondrial por lo que surge la siguiente pregunta: ¿cómo puede una misma mutación inducir patología mitocondrial y longevidad? Esta paradoja confirma lo dicho al principio, la complejidad del proceso de longevidad.

Otra aportación a la relación entre el haplogrupo J y la longevidad es el estudio llevado a cabo en nonagenarios finlandeses en los que además de detectar que los haplogrupos J y Uk eran los más frecuentes entre esa población, encontraban que el haplogrupo H era el menos frecuente (Niemi et al. 2003).

Posteriormente, Dato et al. (2004), plantea el estudio de una población anciana del sur de Italia tras observar los resultados obtenidos por De Benedictis et al. (1999) en los que la asociación de longevidad y haplogrupo J en centenarios italianos se producía en hombres de la región norte de Italia. En este estudio demuestran que, como otros factores genéticos, la variabilidad en la herencia del mtDNA con la longevidad es específica de la población estudiada.

Por último, dada la tasa de mutación del mtDNA debida en parte, a la falta de mecanismos de reparación y a la exposición continuada a radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS), se ha comprobado que las mutaciones del mtDNA se acumulan con la edad en cerebro y músculo de tal manera que se produce un desajuste en el sistema OXPHOS. Con todo ello, ha sido propuesto un modelo que se centra en la interacción genoma nuclear/mitocondrial, presuponiendo una interacción epistática, pero sin efectos aditivos importantes. (Abbot et al. 1987; Tanawa et al. 2000).

AGRADECIMIENTOS

Fundación Rioja Salud. Consejería de Salud de la Rioja.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abellán A. 2003. Longevidad y estado de salud. Envejecer en España. 2: 27-33.
2. Hayflick L. 2000. The future of ageing. *Nature*. 408: 267-269.
3. Ljungquist B., Berg S., Lanke J., McClearn G.E. and Pedersen N.L. 1998. The effect of genetic factors for longevity: a comparison of identical and fraternal twins in the Swedish Twin Registry. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 53: M441-446.
4. Gavrilov L. A. and Gavrilova N.S. 1997. Parental age at conception and offspring longevity. *Clin. Gerontol.* 7: 5-12.
5. Westendorp R., Kirkwood G.J. and Thomas B.L. 1998. Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature*. 396: 743-746.
6. Franceschi C., Mota L., Valensin S., Rapisarda R., Franzone A., Berardelli M., Motta M., Monti D., Bonafè M., Ferrucci L., Deiana L., Pes G.M., Carru C., Desole M.S., Barba C., Sartoli G., Gemelli G., Lescai F., Olivieri F., Marchegiani F., Cardelli M., Cavallone L., Guerresi P., Cossarizza A., Troiano L., Pini G., Sansoni P., Passeri G., Lisa R., Spazzafumo L., Amadio L., Giunta S., Stecconi R., Morresi R., Vitichi C., Mattace R., De Benedictis G. and Baggio G. 2000. Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity?. *Aging (Milano)*. 12: 77-84.
7. Groot C.P., Van den Broek T. and Van Staveren W. 1999. Energy intake and micronutrient intake in elderly Europeans: seeking the minimum requirement in the SENECA study. *Age and Ageing*. 28: 469-474.
8. Nicholls D.G. and Locke R.M. 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev.* 64: 1-64.
9. Smith J.D., Melian A., Leff T. and Breslow J.L. 1988. Expression of the human apolipoprotein E gene is regulated by multiple positive and negative elements. *J. Biol. Chem.* 263: 8300-8308.
10. Barbieri M., Rizzo M.R., Manzella D., Grella R., Ragno E., Carbonella M., Abbatecola A.M. and Paolisso G. 2003. Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians. *Exp. Gerontol.* 38: 137-143.
11. Park SH., Ozden O., Jiang H, Cha YI., Pennington JD., Aykin-Burns N., Spitz DR., Gius D., Kim HS. 2011. Sirt3, mitochondrial ROS, ageing and carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 12 (9): 6226-6239.

12. Hendrie H.C., Ogunniyi A., Halls K.S., Baiyewu O., Unverzagt F.W., Gureje O., Gao S., Evans R.M., Ogunseyinde A.O., Adeyinka A.O., Musick B. and Hui S.L. 2001. Incidence of dementia and Alzheimer disease in 2 communities: Yoruba residing in Idaban, Nigeria, and African Americans residing in Indianapolis, Indiana. *JAMA*. 285: 739-747.
13. Morgan K., Armstrong G.K., Huppert F.A., Brayne C. and Solomou W. 2000. Healthy ageing in urban and rural Britain: a comparison of exercise and diet. *Age and Ageing*. 29: 341-348.
14. Hitt R.Y., Young-Ku Y., Siver M. and Perls T. 1999. Centenarians: the older you get, the healthier you have been. *Lancet*. 354: 652.
15. Rybicki B.A. and Elson R.C. 2000. The relationship between the sibling recurrent-risk ratio and genotype relative risk. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 593-604.
16. Herkskind A.M., McGue M., Holm N.V., Sorensen T.I., Harvald B. and Vaupel J.W. 1996. The heredability of human longevity: a population based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Hum. Genet.* 97: 319- 323.
17. Tan Q., De Benedictis G., Ukraintseva S.V., Franceschi C., Vaupel J.W. and Yashin A.I. 2002. A centenarian-only approach for assessing gene-gene interaction in human longevity. *Eur. J. Hum. Genet.* 10: 119-124.
18. Faure-Delanef L., Baudin B., Beneteau-Burnat B., Beaudoin J.C., Giboudeau J. and Cohen D. 1998. Plasma concentration, kinetic constants, and gene polymorphism of angiotensin I-converting enzyme in centenarians. *Clin. Chem.* 44: 2083-2087.
19. Garasto S., Rose G., De Rango F., Berardelli M., Cosonello A., Feraco E., Mari V., Maletta R., Bruni A., Franceschi C., Carotenuto L. and De Benedictis G. 2003. The study of APOA1, APOC3 and APOA4 variability in healthy ageing people reveals another paradox in the oldest old subjects. *Ann. Hum. Genet.* 67: 54-62.
20. Dahl M., Tybjaerg-Hansen A., Sillesen H., Jensen G., Steffensen R. and Nordestgaard B.G. 2003. Blood pressure, risk of ischemic cerebrovascular and ischemic heart disease, and longevity in alpha-antitrypsin deficiency. *Circulation*. 107: 747- 752.
21. De Benedictis G., Carotenuto L., Carrieri G., De Luca M., Falcone E., Rose G., Calvacanti S., Corsonello F., Feraco E., Baggio G., Bertolini S., Mari D., Mattace R., Yashin A.I., Bonafè M. and Franceschi C. 1998. Gene/longevity association studies at four autosomal loci (REN, THO, PARP, SOD2). *Eur. J. Hum. Genet.* 6: 534-541.
22. Pinderski- Oslund L.J., Hedrick C.C., Olvera T., Hegenbaugh A., Territo M., Berliner J.A. and Fyfe A.I. 1999. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 2847-2853.
23. Bonafè M., Barbieri M., Marchegiani F., Oliveri F., Ragno E., Gampieri C., Mugianesi E., Centurelli M., Franceschi C. and Paolisso G. 2003. Polymorphic variants of insulin-like growth factor 1 (IGF-1)

receptor and phosphoinositide-3-kinase genes affect IGF-1 plasma levels and human longevity: Cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. *Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 3299-3304.

24. Gerdes L.U., Jeune B., Ranberg K.A., Nybo H. and Vaupel J.W. 2000. Estimation of apolipoprotein E genotypic-specific relative mortality risks from the distribution of genotypes in centenarians and middle-aged men: apolipoprotein E gene is a “frailty gene”, not a “longevity gene”. *Genet. Epidemiol.* 19: 202-210.
25. Bonafè M., Marchegiani F., Cardelli M., Oliveri F., Cavallone L., Giovagnetti S., Pieri C., Marra M., Antonicelli R., Troinano L., Guerresi P., Passeri G., Berardelli M., Paolisso G., Barbieri M., Tesi S., Lisa R., De Benedictis G. and Franceschi C. 2002. Genetic analysis of paraoxonase (PON1) locus reveals an increased frequency of Arg192 allele in centenarians. *Eur. J. Hum. Genet.* 10: 292-296.
26. Cawthon R.M., Smith K.R., O’Brien E., Sivatchenko A. and Kerber R.A. 2003. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *The Lancet.* 361: 393-395.
27. Cherif H., Tarry J.L., Ozanne S.E. and Hales C.N. 2003. Ageing and telomeres: a study into organ and gender specific telomere shortening. *Nucleic Acids Res.* 31: 1576-1583.
28. Bischoff C., Petersen H.C., Graakjaer J., Andersen-Ranberg K., Vaupel J.W., Bohr V.A., Kolvraa S. and Christensen K. 2006. No association between telomere length and survival among elderly and oldest old. *Epidemiology.* 17: 190-194.
29. Abbot H.M., Abbey H., Boling D.R. and Murphy E.B. 1987. The familial component in longevity: a study of offspring of nonagenarians. III Intrafamilial studies. *Am. J. Med. Genet.* 2: 109-120.
30. De Benedictis G., Rose G., Carrieri G., De Luca M., Falcone E., Passarino G., Bonafè M., Monti D., Baggio G., Bertolini S., Mari D., Mattace R. and Franceschi C. 1999. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J.* 13: 1532-1536.
31. Niemi A.K., Hervonen A., Hurme M., Karhunen P.J. and Majama A.K. 2003. Mitochondrial DNA polymorphisms associates with longevity in a Finnish population. *Hum. Genet.* 112: 29-33.
32. Tanawa M., Gong J., Zhang J. Yamada Y., Borgeld H.J. and Yagi K. 2000. Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis. *Mech. Ageing Dev.* 116: 65-76.
33. Castri L., Melendez-Obando M., Villegas-Palma R., Barrantes R., Raventos H., Pereira R., Luiselli D., Pattener D., Madrigal L. 2009. Mitochondrial polymorphisms are associated both with increased and decreased longevity. *Hum. Hered.* 67 (3): 147-153.
34. Wallace D.C., Brown M.D. and Lott M.T. 1999. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene.* 238: 211-230.
35. Von Zglinicki T. 2000. Reserch on ageing in Germany. *Exp. Gerontol.* 35: 259-270.

36. Chance B. and Sies H. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59 (3): 527-605.
37. Shigenaga M.K. and Hagen T.M. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(23): 10771-10778.
38. Boveris A. and Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707-716.
39. Nohl H. and Hegner D. 1978. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?, *Eur. J. Biochem.* 82: 563-567.
40. Freeman B.A. and Crapo J.D. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412-426.
41. Browne S.E. and Bowling A.C. 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* 41: 646-653.
42. Wei Y.H.C. and Lu C.Y. 1998. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 854: 155-170.
43. Michikawa Y. and Attardi G. 2002. Screening for aging-dependent point mutations in mtDNA. *Methods Mol. Biol.* 197: 75-92.
44. Michikawa Y. and Mazzucchelli F. 1999. Aging-dependent large accumulation of point mutation in the human mtDNA control region for replication. *Science.* 286: 774-779.
45. Coskun P.E., Ruiz-Pesini E. and Wallace D.C. 2003. Control region mtDNA variants: longevity, climatic adaptation, and forensic conundrum. *PNAS.* 100: 171-176.
46. Klein J.A. and Ackerman S.L. 2003. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 111: 785-793.
47. Ruiz-Pesini E., Mishmar D., Brandon M., Procaccio V. and Wallace D.C. 2004. *Science.* 303: 223-226.
48. Wallace D.C. 1994b. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (19): 8739-8746.
49. Wallace D.C. 1995. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging. *Am. J. Hum. Genet.* 57 (2): 201-223.
50. Quintana-Murci L., Semino O., Bandelt H.J., Passarino G., McElravey K. and Santachiara-Benerecetti A.S. 1999. Genetic evidence of an early exit of *Homo sapiens sapiens* from Africa through eastern Africa. *Nat. Genet.* 23: 437-441.
51. Torroni A., Lott M.T., Cabell M.F., Chen Y.S., Lavergne L. and Wallace D.C. 1994. MtDNA and the origin of caucasians: identification of ancient caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 760-776.

52. Torroni A., Huoponen K., Francalacci P., Petrozzi M., Morelli L., Scozzari R., Obinu D., Savontaus M.J. and Wallace D.C. 1996. Classification of european mtDNAs from an analysis of three european populations. *Genetics*. 144: 1835-1850.
53. Torroni A., Richards M., Macaulay v., Forster P., Villems R., Norby S., Savontaus M.L., Huoponen K., Scozzari R. and Bandelt H.J. 2000. MtDNA haplogroups and frequency patterns in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1173-1177.
54. Macaulay, V., M. Richards, et al. 1999. The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 232-49.
55. Torroni A., Schurr T.G., Yang C.C., Szathmary E.J.E., Williams R.C., Schanfield M.S., Troup G.A., Knowler W.C., Lawrence D.N., Weiss K.M. and Wallace D.C. 1992. Native american mitochondrial DNA analysis indicates that the amerind and the nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics*. 130: 153-162.
56. Hofmann S., Jaksch M., Bezold R., Mertens S., Aholt S., Paprotta A. and Gerbitz K.D. 1997b. Populations genetics and disease susceptibility: characterization of central european haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D-loop variants and association with disease. *Hum. Mol. Genet.* 6: 1835-1846.
57. Brand F.N., Kiely D.K., Kannel W.B. and Myers R.H. 1992. Family patterns of coronary heart disease mortality: the Framingham Longevity Study. *J. Clin. Epidemiol.* 45: 169-174.
58. Tanaka M., Gomg J.S., Zhang J., Yoneda M. and Yagi K. 1998. Mitochondrial genotype associated with longevity. *Lancet*. 351: 185-186.
59. Tanawa M., Gong J., Zhang J. Yamada Y., Borgeld H.J. and Yagi K. 2000. Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis. *Mech. Ageing Dev.* 116: 65-76.
60. Ivanova R., Lepage V., Charron D. and Schachter F. 1998. Mitochondrial genotype associated with French Caucasian centenarians. *Gerontology*. 44: 349.
61. Ross O.A., McCormack R., Curran M.D. et al. 2001. Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population. *Exp. Gerontol.* 36: 1161-1178.
62. Chen Y.S., Torroni A., Excoffier L., Silvana Santachiara-Benerecetti A. and Wallace D.C. 1995. Analysis of mtDNA variation in african populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 133-149.
63. Rose G., Passarino G., Carrieri G., Altomare K., Greco V., Bertolini S., Bonafè M. Franceschi C. and De Benedictis G. 2001. Paradoxes in longevity: sequence analysis of mtDNA haplogroup J in centenarians. *Eur. J. Hum. Genet.* 9: 701-707.
64. Dato S., Passarino G., Rose G., Altomare K., Bellizi D., Mari D., Feraco E., Franceschi C. and De Benedictis G. 2004. Association of the mitochondrial DNA haplogroup J with longevity is population specific. *Eur. J. Hum. Genet.* 12: 1080-1082.