

Revisión

Envejecimiento y reproducción: una cuestión de gónadas



Mercedes M. Pérez-Jiménez* y Manuel J. Muñoz

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD),

Universidad Pablo de Olavide/CSIC/JA, Crta. Utrera Km1. 41013 Sevilla

*mmperjim@upo.es

Palabras clave: envejecimiento, *Caenorhabditis elegans*, línea germinal

RESUMEN

A pesar de que el envejecimiento es un proceso conocido desde la antigüedad, sus reglas y normas todavía no se comprenden completamente. Con esta revisión queremos arrojar luz sobre el complejo mundo de la regulación genética del envejecimiento, específicamente en la regulación de la longevidad dependiente del estado reproductivo del animal. Los estudios genéticos sugieren la existencia de señales lanzadas desde la línea germinal al resto del animal, que determinaría la vida media de éste. En el nematodo *Caenorhabditis elegans* se ha visto que estas señales están integradas en un diálogo con señales provenientes del medio y con otros tejidos, siendo el balance entre todas ellas el que determina finalmente el retraso en el envejecimiento. Esta regulación parece estar evolutivamente conservada, ya que la ausencia o modificaciones de línea germinal en distintas especies, desde invertebrados hasta mamíferos, genera un incremento de longevidad.

Estas ideas han desembocado en una de las teorías actualmente más populares sobre el envejecimiento, la *Teoría del Soma Deshechable* (Kirkwood, 1977; Kirkwood & Holliday, 1979; Kirkwood & Rose, 1991) en la que se expone que los organismos tienen recursos energéticos limitados y a lo largo de la vida deben elegir entre hacer un mantenimiento/repación del soma o reproducirse, ambos procesos requieren grandes cantidades de energía y, por tanto, cuando uno ocurre, el otro está disminuido. Las condiciones ambientales a las que debe enfrentarse el organismo determina la decisión de dónde debe alojarse la inversión energética. Si las condiciones son buenas lo que aporta una mayor eficacia biológica es la reproducción, sin embargo si las condiciones no garantizan la supervivencia de los descendientes, la inversión de energía en la reparación y mantenimiento del soma es lo más conveniente, ya que de esa manera se protege la línea germinal, retrasando la reproducción hasta que las condiciones ambientales sean más adecuadas.

1. REVISIÓN

1.1. Teorías del envejecimiento

Actualmente una de las definiciones de envejecimiento más aceptada es la que presentó Kirkwood en el 2005, que define el envejecimiento como una pérdida de funciones, progresiva y generalizada, que conlleva a un descenso de la fertilidad, un aumento de la vulnerabilidad ante las condiciones ambientales, así como un incremento de las posibilidades de padecer enfermedades y morir. (Kirkwood, 2005 a).

Muchos han sido los autores que han intentado comprender la causa del envejecimiento, como ejemplo se puede exponer la revisión de Medvedev en la que nos presenta hasta 300 teorías que intentan explicarlo (Medvedev, 1990). Sin embargo, las razones moleculares y evolutivas de por qué se produce este fenómeno aún no se entienden completamente. Algunas de las ideas más aceptadas son que el envejecimiento es un proceso multifactorial y que no existe una programación para envejecer, aunque si existen genes cuya función consiste en reparar daños celulares o evitarlos, y su activación permite el incremento de longevidad (Kirkwood & Rose, 1991; Kirkwood & Austad, 2000; Kirkwood, 2003; 2005 a y b; 2011).

1.2. Control genético del envejecimiento y *Caenorhabditis elegans*

Desde que en 1983 Michael Klass publicara su trabajo "A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results" (Klass, 1983) un nuevo campo de estudio abrió sus puertas, el control genético del envejecimiento y *Caenorhabditis elegans* se convirtió en objeto de estudio destacado en este campo.

C. elegans es un nematodo de vida libre que se alimenta de microorganismos, en la naturaleza se encuentra en el suelo y se ha podido aislar en casi todas las partes del mundo (Barrier & Felix, 2005). Su uso como organismo modelo comenzó en los años 60 de la mano del biólogo molecular Sydney Brenner y desde entonces su popularidad ha crecido enormemente debido a su facilidad de manipulación en el laboratorio, como son el poder crecer este animal en placas de Petri o en matraces en medio líquido como si fuera un microorganismo, su rápido ciclo de vida de aproximadamente tres días o su capacidad de sobrevivir a la congelación (Brenner, 1974). Además este animal ha sido completamente secuenciado, observándose que posee un 40% de genes homólogos con el genoma humano (Hodgkin et al. 1995; Hodgkin & Herman, 1998). En el campo del estudio de la longevidad, a estas ventajas, se añade que la forma en que envejece

este nematodo muestra similitudes a cómo lo hacen los mamíferos, por ejemplo, la disminución de la movilidad o sarcopenia (Herndon et al. 2002; Huang et al. 2004; Hsu et al. 2009), disminución de la capacidad reproductiva (Hughes et al. 2007) o el incremento de la susceptibilidad a infecciones (Garigan et al. 2002; Garsin et al. 2003).

El conocimiento y la comprensión de la regulación de la longevidad no es fácil, hasta ahora los descubrimientos realizados apuntan que las señales del medio y del propio organismo están en continuo contacto mediante múltiples rutas de señalización que sopesan cuál es la situación en cada momento. Éstas rutas muestran un complejo entramado entre ellas que en algunos casos desembocan en elementos de regulación comunes, siendo posiblemente el balance de todas ellas el que determina al final el camino a seguir, si reproducción o reparación y por lo tanto incremento de longevidad.

1.3. Reproducción y longevidad en *Caenorhabditis elegans*

Cómo ya hemos visto, según la *Teoría del Soma Deshechable*, en condiciones ambientales desfavorables para la reproducción los organismos podrían incrementar la tasa de reparación y retrasar la reproducción como medida de supervivencia, hasta el retorno de condiciones favorables que aseguren la supervivencia de la descendencia, provocando un incremento de la longevidad del soma y la línea germinal (Kirkwood, 1977; Kirkwood and Holliday, 1979; Kirkwood and Rose, 1991). Este hecho explicaría el efecto de incremento de longevidad que se ha observado en numerosas especies bajo restricción dietaria (McCay et al. 1935; Klass, 1977; Chippindale et al. 1993; Kaerberlein et al. 2002; Colman et al. 2009) y la existencia de mutantes longevos (Guarente & Kenyon, 2000; Kenyon, 2010), ya que estos mutantes imitan la respuesta a condiciones desfavorables, incluso en situaciones adecuadas para la reproducción.

En *C. elegans* los mecanismos moleculares de esta regulación empiezan a conocerse y uno de los elementos que están tomando protagonismo son las gónadas, ya que se ha observado que la eliminación de la línea germinal provoca un incremento de longevidad. Este incremento no se produce por el mero hecho de ser estéril o la ausencia de las gónadas *per se*, ya que la ablación completa de la gónada no afecta a la longevidad, ni tampoco la ausencia del esperma, los oocitos o los precursores meióticos (Kenyon et al. 1993; Arantes-Oliveira et al. 2002). Esta regulación parece ser mucho más compleja y multifacética, integrando la señalización de nutrientes y el estado reproductivo (Lapierre & Hansen, 2012), mediante un diálogo entre la línea germinal, la gónada somática y el resto de tejidos. La eliminación sólo de la línea germinal, bien mediante ablación de las células precursoras con láser o bien mediante mutaciones en genes necesarios para la proliferación celular de la línea germinal, incrementa longevidad dependiente de los factores de transcripción DAF-16/FOXO y DAF-12/FXR (Hsin & Kenyon, 1999; Arantes-Oliveira et al. 2002; Berman & Kenyon, 2006) (Figura 1) y dependiente de la presencia de la gónada somática, lo que sugiere que ambas señalizaciones son contrapuestas, siendo la señal desde línea germinal de disminución de longevidad y la de gónada somática de extensión (Hsin & Kenyon, 1999).

La ausencia de la línea germinal en el adulto de *C. elegans* induce la localización nuclear, principalmente en las células intestinales, del factor de transcripción DAF-16 (Lin et al. 2001), el cuál se ha descrito que participa además en otras rutas de longevidad, como en la evolutivamente conservada ruta de señalización de la insulina/IGF (Landis & Murphy, 2010; Kenyon, 2010). Además de este factor de transcripción, el incremento de longevidad en ausencia de línea germinal, comparte otros elementos necesarios para su activación con la ruta de la insulina/IGF como el factor de transcripción HSF-1, el factor hormonal nuclear de transcripción DAF-12 indicado anteriormente, la fosfatasa DAF-18/PTEN y el cofactor SMK-1/SMEK1 (Hansen et al. 2005; Berman & Kenyon, 2006; Wolff et al. 2006;). Al igual que en los mutantes del receptor de la insulina *daf-2*, los mutantes sin línea germinal activan vía DAF-16 genes del metabolismo de lípidos como *lipl-4* (Wang et al. 2008). A pesar de estos factores comunes no parece que ambas rutas funcionen en una única vía ya que por un lado la longevidad de mutantes de la ruta de la insulina/IGF incrementa todavía más en ausencia de la línea germinal (Hsin & Kenyon, 1999), y por otro las dianas transcripcionales de DAF-16 no solapan completamente entre ambas rutas (Murphy et al. 2003; McCormick et al. 2012). Además se han descubierto una serie de elementos esenciales y específicos para la longevidad proveniente de línea germinal como son la proteína KRI-1/KRIT-1, necesaria para la localización nuclear intestinal de DAF-16 y la activación del factor de elongación de la transcripción TCER-1/TCERG1, que junto a DAF-16 y las proteínas PHI-62 de unión a ARN y FTT-2/14-3-3 de interacción con FOXO, activan la transcripción de genes necesarios para la longevidad en ausencia de línea germinal (Berman & Kenyon, 2006; Ghazi et al. 2009; McCormick et al. 2012) (Figura 1). Recientemente se ha propuesto que por debajo de las rutas de insulina/IGF y la de ausencia de línea germinal se sitúa LET-418/Mi2 un remodelador de la cromatina dependiente de ATP, que podría estar participando en la relocalización de recursos entre mantenimiento del soma o reproducción, su actividad depende de DAF-16 y parece estar situada por debajo o en paralelo a KRI-1 y TCER-1, actuando sobre la expresión de genes de longevidad y resistencia a estrés en estos animales (de Vaux et al. 2013).

Otro mecanismo que se ha visto que está involucrado, al igual que en otras rutas de longevidad, es la autofagia ya que se activan genes esenciales de autofagia como *unc-51* o *lgg-1* vía factor de transcripción PHA-4/FOXA (Figura 1). Curiosamente, para el incremento de longevidad en ausencia de línea germinal, la autofagia sólo es necesaria en hipodermis e intestino, es más se necesita para mantener alta la actividad de la lipasa *lipl-4* en estos animales, gen esencial para el incremento de longevidad (Lapierre et al. 2011). Cabe resaltar la reciente descripción del papel que juega la línea germinal en el incremento de longevidad producido al mutar las rutas de la insulina/IGF y TOR, parece que el efecto sinérgico que aparece en el doble mutante de ambas rutas depende de la activación de AMPK y DAF-16 vía señalización desde línea germinal (Chen et al. 2013), este es un ejemplo más de la complejidad e interconexión de las rutas que gobiernan el envejecimiento.

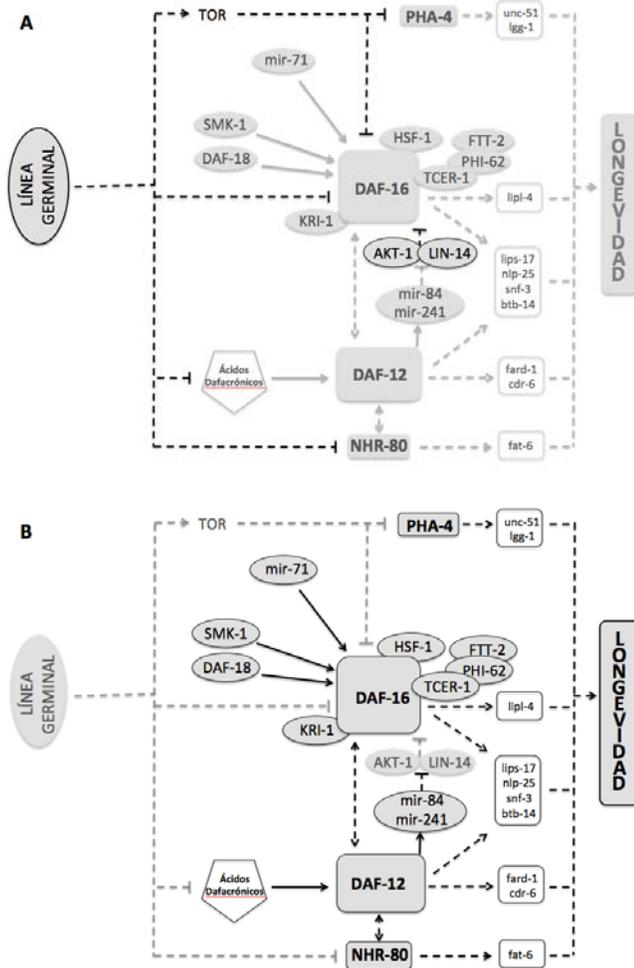


Figura. 1. Esquema de la regulación de longevidad por la línea germinal de *C. elegans*. **A.** En condiciones favorables para la reproducción la línea germinal emite señales que activan el programa reproductivo y, por consecuencia, una vida media normal. En esas condiciones los factores de transcripción que regulan esta ruta se encuentran apagados. **B.** En ausencia de línea germinal faltan las señales de inhibición sobre los factores de transcripción y éstos activan toda una serie de genes que incrementan longevidad. Ver más detalle en el texto.

El sistema nervioso también tiene un papel fundamental específicamente en la regulación de la longevidad que proviene de la línea germinal, estando regulada la localización y la activación transcripcional de DAF-16 en intestino por mir-71 un microRNA, siendo suficiente su expresión desde neuronas (Boulias & Horvitz, 2012).

Todos estos datos sugieren una regulación endocrina, en la que participan distintos tipos de tejidos y de hecho el papel que ejerce el receptor hormonal nuclear DAF-12 en esta ruta es complejo y multifacético. En ausencia de la línea germinal DAF-12 se requiere al menos en parte para la localización nuclear en el intestino de DAF-16, lo que apoya la actuación de una señalización hormonal

lipofílica (Berman & Kenyon, 2006). DAF-12 en esta ruta, al igual que en el caso de la ruta de la insulina/IGF, responde a la unión con sus ligandos del tipo hormonas esteroidéas, los ácidos dafacrónicos (Gerisch et al. 2007) (Figura 1). Las señales emitidas desde la gónada somática, como ya hemos comentado anteriormente, afectan de forma opuesta en la longevidad a las de la gónada germinal. Este tipo de señales todavía no se conocen con exactitud, aunque parece que la síntesis de los ligandos de DAF-12, los ácidos dafacrónicos son los responsables de ésta (Yamawaki et al. 2010).

Muchos de los genes activados en ausencia de línea germinal están relacionados con el metabolismo de las grasas como la lipasa *lipI-4* regulado por DAF-16 o la reductasa de ácidos grasos *fard-1* por DAF-12 (Wang et al. 2008; McCormick et al. 2012), además DAF-16 también regula genes necesarios para la síntesis de hormonas esteroidéas, lo que parece indicar que existe un diálogo entre DAF-16 y DAF-12 en ambos sentidos. Por su parte DAF-12 es capaz de activar los miRNAs, *mir-84* y *mir-241*, los cuáles se ha visto que inhiben a AKT-1 y LIN-14, activando la actividad transcripcional de DAF-16 (Shen et al. 2012). Es más, se han descrito varias dianas reguladas tanto por DAF-16 como por DAF-12 como son *nlp-25*, *snf-3*, *btb-14* o la lipasa *lips-17* (McCormick et al. 2012). DAF-12 por su parte también actúa sobre dianas específicas como el gen de respuesta a cadmio *cdr-6* o la reductasa de ácidos grasos *fard-1* (Yamawaki et al. 2010; McCormick et al. 2012). Otro de los papeles de DAF-12 en esta ruta podría ser el de inducir la expresión del receptor hormonal NHR-80, necesario para el incremento de longevidad de esta ruta, el cual regula la síntesis de ácido oleico mediante la expresión de las desaturasas de ácidos grasos como *fat-6* (Goudeau et al, 2011) (Figura 1).

1.4. Control del envejecimiento desde gónadas en la evolución

Además, de las evidencias que acabamos de exponer sobre la regulación de la longevidad dependiente del estado reproductivo en el nematodo *C. elegans*, existen distintos estudios que sugieren su conservación evolutiva, ya que intervenciones en las gónadas de distintas especies los hacen más longevas.

La ausencia de línea germinal en el nematodo *Pristionchus pacificus* aumenta su vida media y, al igual que en *C. elegans*, no se ve afectada si se elimina toda la gónada (Hsin & Kenyon, 1999), es más, también depende de los factores de transcripción homólogos a DAF-16 y DAF-12 (Rae et al. 2012). Este efecto también se observa en *Caenorhabditis briggsae* y en *Pristionchus maupasii* aunque no esta universalmente conservado dentro del orden Rhabditid al que pertenece *C. elegans*, ya que la ablación de la línea germinal en distintas especies del género *Oscheius* y *Rhabditis* no genera un incremento de longevidad (Patel et al. 2002).

En *Drosophila* la primera evidencia de esta regulación proviene de mutantes estériles de *D. sobobscura* que viven más que los silvestres fértiles (Maynard Smith, 1958). Posteriormente en *D. melanogaster* se ha observado que la ablación de las células germinales también genera un incremento de longevidad mediante la activación del homólogo a DAF-16/dFOXO y regulando la ruta

se señalización de la insulina/IGF (Flatt et al. 2008). En saltamontes ovariectomizados también aparece un incremento de la longevidad, en parte por una mayor disposición de proteínas (Hatle et al. 2008).

En vertebrados también se han establecidos relaciones de longevidad y línea germinal. Los estudios realizados por Robertson en salmones indican que la repentina muerte que sobreviene tras el desove se debe a la maduración del tejido gonadal, de hecho la castración incrementa su esperanza de vida (Robertson, 1961 a y b).

En ratones se ha observado que la castración incrementa longevidad (Drori & Folman, 1976) y además se ha comprobado que trasplantar ovarios de una ratona joven a una vieja incrementa la vida media de ésta (Cargill et al. 2003) y mutantes que tienen retrasada la menopausia mejoran los efectos relacionadas con la edad (Pérez et al. 2007), lo que sugiere que la gónada en mamíferos también produce señales que regulan longevidad. En ratas, donde la hembra en las mismas condiciones vive más que el macho, la ovariectomía acorta la vida media de las hembras, mientras que la castración incrementa la de los machos. Es más la suplementación en ratas ovariectomizadas con hormonas sexuales femeninas no afecta su vida media, sin embargo, incrementa la de los machos (Asdell et al. 1967), lo que pone en evidencia la importancia de las hormonas esteroideas en la regulación de la longevidad también en este organismo. El momento en el que se realiza la gonadectomía es esencial, produciéndose un mayor incremento cuanto más joven se produce la intervención (Talbert & Hamilton, 1974). Estudios poblacionales de gatos y perros domésticos muestran que la esterilización en esos animales también incrementa longevidad (Hamilton, 1965; Hoffman et al. 2013).

Sorprendentemente una respuesta similar se ha observado también en humanos como muestran dos estudios poblacionales, el primero se ha realizado sobre eunucos y no eunucos con retardo mental y un segundo estudio sobre eunucos coreanos, ambos estudios han revelado un incremento de longevidad de los eunucos respecto a sus contemporáneos no castrados (Hamilton & Mestler, 1969; Min et al. 2012).

2. CONCLUSIONES

Los datos presentados indican la existencia de una regulación del envejecimiento dirigido por el estado reproductivo del animal y que está en constante diálogo con la situación, externa e interna del organismo. Además, la aparición de un incremento similar al eliminar las gónadas en distintas especies, desde invertebrados hasta mamíferos, muestra que es un mecanismo conservado en la evolución.

Posiblemente nos encontramos en disposición de imitar la ausencia de línea germinal, sin llegar a eliminarla, con fármacos que imiten su ausencia. Para ello, es necesario el completo entendimiento de las rutas que lo rigen y las señales que participan.

AGRADECIMIENTOS

A la Junta de Andalucía por financiar a MMPJ, dentro del marco de Proyectos de Excelencia CVI-02697.

BIBLIOGRAFIA

- Arantes-Oliveira N, Apfeld J, Dillin A, Kenyon C (2002) Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 295(5554):502-5.
- Asdell SA, Doornenbal H, Joshi SR, Sperling GA (1967) The effects of sex steroids hormones upon longevity in rats. *L. Reprod. Fert* 14:113-120.
- Barriere A and Felix MA (2005) High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations. *Current Biology*, 15 (13): 1176-1184.
- Berman JR and Kenyon C (2006) Germ-cell loss extends *C. elegans* life span through regulation of DAF-16 by kri-1 and lipophilic-hormone signaling. *Cell*. 124(5):1055-68.
- Boulias K and Horvitz HR (2012) The *C. elegans* MicroRNA mir-71 Acts in Neurons to Promote Germline-Mediated Longevity through Regulation of DAF-16/FOXO. *Cell Metab*. 15(4):439-50.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77(1):71-94.
- Cargill SL, Carey JR, Müller HG, Anderson G (2003) Age of ovary determines remaining life expectancy in old ovariectomized mice. *Aging Cell*. 2(3):185-90.
- Chen D, Li PW, Goldstein BA, Cai W, Thomas EL, Chen F, Hubbard AE, Melov S, Kapahi P (2013) Germline signaling mediates the synergistically prolonged longevity produced by double mutations in *daf-2* and *rsk-1* in *C. elegans*. *Cell Rep*. 2013 Dec 26;5(6):1600-10.
- Chippindale AK, Leroi AM, Kim SB, Rose MR (1993) Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution. I. Nutrition and the cost of reproduction. *J. Evol. Biol*. 6:171-93.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in *rhesus* monkeys. *Science*. 325(5937):201-4.
- De Vaux V, Pfefferli C, Passannante M, Belhaj K, von Essen A, Sprecher SG, Müller F, Wicky C. (2013) The *Caenorhabditis elegans* LET-418/Mi2 plays a conserved role in lifespan regulation. *Aging Cell*. 2013 Dec;12(6):1012-20.
- Drori D, Folman Y (1976) Environmental effects on longevity in the male rat: exercise, mating, castration and restricted feeding. *Exp Gerontol*. 1976;11(1-2):25-32.
- Flatt T, Min KJ, D'Alterio C, Villa-Cuesta E, Cumbers J, Lehmann R, Jones DL, Tatar M (2008) *Drosophila* germ-line modulation of insulin signaling and lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(17):6368-73.
- Garigan D, Hsu A, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Kenyon C (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* 161: 1101-1112.

- Garsin DA, Villanueva JM, Begun J, Kim DH, Sifri CD, Calderwood SB, Ruvkun G, Ausubel FM (2003) Long-lived *C. elegans* daf-2 mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science*. 300: 1921.
- Gerisch B, Rottiers V, Li D, Motola DL, Cummins CL, Lehrach H, Mangelsdorf DJ, Antebi A (2007) A bile acid-like steroid modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan through nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(12):5014-9.
- Ghazi A, Henis-Korenblit S, Kenyon C (2009) A transcription elongation factor that links signals from the reproductive system to lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Genet*. 5(9):e1000639. Epub 2009 Sep 11.
- Goudeau J, Bellemin S, Toselli-Mollereau E, Shamalnasab M, Chen Y, Aguilaniu H (2011) Fatty acid desaturation links germ cell loss to longevity through NHR-80/HNF4 in *C. elegans*. *Plos Biol*. 9(3):e1000599. Epub 2011 Mar 15.
- Guarente L and Kenyon C (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*. 408, 255-262.
- Hamilton JB (1965) Relationship of castration, spaying, and sex to survival and duration of life in domestic cats. *J. Gerontol*. 20:96-104.
- Hamilton JB and Mestler GE (1969) Mortality and survival: comparison of eunuchs with intact men and women in a mentally retarded population. *J Gerontol*. 24: 395-411.
- Hansen M, Hsu AL, Dillin A, Kenyon C (2005) New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen. *PLoS Genet*. 1(1):119-28.
- Hatle JD, Paterson CS, Jawaid I, Lentz C, Wells SM, Fronstin RB (2008) Protein accumulation underlying lifespan extension via ovariectomy in grasshoppers is consistent with the disposable soma hypothesis but is not due to dietary restriction. *Exp Gerontol*. 2008 Oct;43(10):900-8.
- Herndon LA, Schmeissner PJ, Dudaronek JM, Brown PA, Listner KM, Sakano Y, Paupard MC, Hall DH, Driscoll M (2002) Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature*. 419, 1117-1123.
- Hodgkin J, Plasterk RH, Waterston RH (1995) The nematode *Caenorhabditis elegans* and its genome. *Science*. 270(5235):410-4.
- Hodgkin J and Herman RK (1998) Changing styles in *C. elegans* genetics. *Trends Genet*. 14(9):352-7.
- Hoffman JM, Creevy KE, Promislow DEL (2013) Reproductive capability is associated with lifespan and cause of death in companion dogs. *PLOS one* 8(4):e61082.
- Hsu AL, Feng Z, Hsieh MY, Xu XZ (2009) Identification by machine vision of the rate of motor activity decline as a lifespan predictor in *C. elegans*. *Neurobiol. Aging* 30, 1498-1503.
- Huang C, Xiong C, Kornfeld K (2004) Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8084-8089.
- Hughes SE, Evason K, Xiong C, Kornfeld K (2007) Genetic and pharmacological factors that influence reproductive aging in nematodes. *PLoS Genet*. 3, e25.
- Hsin H and Kenyon C (1999). Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* 399, 362-366.
- Kaeberlein M, Andalis AA, Fink GR, Guarente L (2002) High Osmolarity Extends Life Span in *Saccharomyces cerevisiae* by a Mechanism Related to Calorie Restriction *Mol. Cell. Biol*. 22:8056-66.
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461-464.
- Kenyon C (2010) A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Aug;1204:156-62.
- Kirkwood TB (1977) Evolution of ageing. *Nature*. 1977 Nov 24;270(5635):301-4.
- Kirkwood TB and Holliday R. (1979) The evolution of ageing and longevity. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1979 Sep 21;205(1161):531-46.
- Kirkwood TB and Rose MR (1991) Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 332, 15-24.
- Kirkwood TB and Austad SN (2000) Why do we age? *Nature*. 408(6809):233-8. Review.
- Kirkwood TB (2003) Genes that shape the course of ageing. *Trends Endocrinol Metab*. 14(8):345-7.
- Kirkwood TB (2005) a Time of our lives. What controls the length of life? *Cell*. 120(4): 437-447.
- Kirkwood TB (2005) b Understanding the odd science of aging. *EMBO Rep. Spec No*:S4-8.
- Kirkwood TB (2011) Systems biology of ageing and longevity. *Phil. Trans. R. Soc. B* 366, 64-70.
- Klass MR (1977) Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: Major biological and environmental factors influencing life span. *Mechanisms of Ageing and Development*, 6: 413-429.
- Klass MR (1983). A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech Ageing Dev* 22, 279-286.
- Landis JN and Murphy CT (2010). Integration of diverse inputs in the regulation of *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO. *Dev Dyn* 239, 1405-1412.
- Lapierre LR, Gelino S, Meléndez A, Hansen M (2011) Autophagy and lipid metabolism coordinately modulate life span in germline-less *C. elegans*. *Curr Biol*. 21(18):1507-14.
- Lapierre LR and Hansen M (2012) Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity. *Trends Endocrinol Metab*. Aug 30. review
- Lin, K, Hsin H, Libina N, Kenyon C (2001). Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet* 28, 139-145.
- Maynard Smith J (1958) The effects of temperature and of egg-laying on the longevity of *Drosophila subobscura*. *J. Exp. Biol*. 35:832-842.

McCay CM, Crowell MF, Maynard LA (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate size. *J Nutr.* 10:63–79.

McCormick M, Chen K, Ramaswamy P, Kenyon C (2012) New genes that extend *Caenorhabditis elegans*' lifespan in response to reproductive signals. *Aging Cell.* 11(2):192-202.

Medvedev Z A (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65, 375-398.

Min K-J, Lee C-K, Park H-N (2012) The lifespan of Korean eunuchs. *Current Biology* Vol 22 No 18 . 792-3.

Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424(6946): 277-283.

Patel MN, Knight CG, Karageorgi C, Leroi AM (2002) Evolution of germ-line signals that regulate growth and aging in nematodes. *PNAS.* 99(2): 769–774.

Perez GI, Jurisicova A, Wise L, Lipina T, Kanisek M, Bechard A, Takai Y, Hunt P, Roder J, Grynopas M, Tilly JL (2007) Absence of the proapoptotic Bax protein extends fertility and alleviates age-related health complications in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(12):5229-34.

Rae R, Sinha A, Sommer RJ (2012) Genome-Wide Analysis of Germline Signaling Genes Regulating Longevity and Innate Immunity in the Nematode *Pristionchus pacificus*. *PLoS Pathog.* 8(8):e1002864.

Robertson OH (1961) a Prolongation of the life span of Kokanee Salmon (*Oncorhynchus nerka kennerlyi*) by castration before beginning of gonad development. *PNAS.* 47(4):609-21.

Robertson OH (1961) b Relation of gonadal maturation to length of life in *Pacific salmon*. *Fed Proc.* 20(Suppl 8):29-30.

Shen Y, Wollam J, Magner D, Karalay O, Antebi A (2012) A steroid receptor-microRNA switch regulates life span in response to signals from the gonad. *Cell Metab.* 2013 Aug 6;18(2):212-24.

Talbert GB and Hamilton JB (1974) Duration of life in Lewis strain of rats after gonadectomy at birth and at older ages. [Book.google.com](http://book.google.com)

Wang MC, O'Rourke EJ, Ruvkun G (2008) Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans* *Science.* 2008 Nov 7;322(5903):957-60.

Wolff S, Ma H, Burch D, Maciel GA, Hunter T, Dillin A (2006) SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity. *Cell.* 124(5): 1039-1053.

Yamawaki TM, Berman JR, Suchanek-Kavipurapu M, McCormick M, Gaglia MM, Lee SJ, Kenyon C (2010) The Somatic Reproductive Tissues of *C. elegans* Promote Longevity through Steroid Hormone Signaling. *PLoS Biol.* 8(8).