



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

“NUTRICIÓN DE PRECISIÓN PARA MODULAR EL RITMO DE
SENESCENCIA BIOLÓGICA EN PACIENTES DE ALTO RIESGO
CARDIOVASCULAR”

“PRECISION NUTRITION TO MODULATE THE RHYTHM OF
BIOLOGICAL SENESECE IN PATIENTS AT HIGH
CARDIOVASCULAR RISK”

Trabajo presentado por Cristina Hidalgo Moyano, Licenciada en Medicina, para
optar al grado de Doctor.

Directores: Javier Delgado Lista y Pablo Pérez Martínez.

Programa de doctorado en Biomedicina.

Fdo.: Cristina Hidalgo Moyano

Córdoba, noviembre de 2023

TITULO: *Nutrición de precisión para modular el ritmo de senescencia biológica en pacientes de alto riesgo cardiovascular*

AUTOR: *Cristina Hidalgo Moyano*

© Edita: UCOPress. 2024
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS

Este documento se presentará junto con el depósito de la tesis en <https://moodle.uco.es/ctp3/>



DOCTORANDA/O

CRISTINA HIDALGO MOYANO

TÍTULO DE LA TESIS:

NUTRICIÓN DE PRECISIÓN PARA MODULAR EL RITMO DE SENESCENCIA BIOLÓGICA EN PACIENTES DE ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR

INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma)

D. JAVIER DELGADO LISTA, PROFESOR TITULAR, Y D. PABLO PÉREZ MARTÍNEZ, CATEDRÁTICO, DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado “Nutrición de precisión para modular el ritmo de senescencia biológica en pacientes de alto riesgo cardiovascular”, ha sido realizado por Dña. Cristina Hidalgo Moyano, bajo nuestra dirección, dentro del Programa de Doctorado en Biomedicina, en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), dentro del grupo GC9: Nutrigenómica. Síndrome Metabólico. Este trabajo ha conseguido un nivel científico de suficiente relevancia como demuestra la aceptación a la publicación de un artículo en la revista internacional Nutrients 2022 Sep 14;14(18):3789. doi: 10.3390/nu14183789, con un índice de impacto de 5,9 y en el primer cuartil de su categoría.

Ha obtenido una Mención en el congreso nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis de 2017. A nuestro juicio, reúne los méritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 29 de noviembre de 2023

Las/los directoras/es

Fdo.: _____
Nombre y Apellidos

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. **Francisco Pérez Jiménez** y **José López Miranda** por ser ejemplo de trabajo, sabiduría, y defensa del conocimiento científico y la investigación como herramienta para ser profesionales de calidad.

A los Dres. **Javier Delgado Lista** y **Pablo Pérez Martínez** por su confianza en mí y por su ayuda en el desarrollo de mi residencia y de esta tesis.

A los Dres. **Juan Francisco Alcalá Díaz**, **Ana María Ortiz Morales**, **Francisco Fuentes Giménez** y **Antonio García Ríos** por ser, además de ejemplo, apoyo.

A los Dres. **Oriol Rangel Zúñiga** y **Francisco Gómez Delgado**, gracias a su ayuda he podido sacar adelante este proyecto.

A los **compañeros médicos** del Servicio de Medicina Interna del Hospital Reina Sofía por su esfuerzo diario, por transmitirme sus conocimientos y por cuidar de las personas enfermas. A todos los profesionales sanitarios que han influido de alguna manera en mi formación y en mi vida personal.

A los Dres. **Antonio Pablo Arenas de Larriva** y **Beatriz Gómez Marín**, además de compañeros amigos, por estar ahí siempre y para todo.

A los **pacientes** que participan en los estudios, y a los de la práctica clínica habitual, por su colaboración y por su paciencia.

A mi familia.

A todos, gracias.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	6
II. INTRODUCCIÓN.....	8
1. ENVEJECIMIENTO.....	8
1.1. VÍAS BIOLÓGICAS DE ENVEJECIMIENTO CELULAR.....	9
1.2. BIOMARCADORES DE ENVEJECIMIENTO.....	18
1.3. ENVEJECIMIENTO CELULAR	21
2. NUTRICIÓN	26
2.1. RELACIÓN DIETA-ENVEJECIMIENTO CELULAR	26
3. GENÉTICA.....	29
4. CONCLUSIÓN/RESUMEN DE LA INTRODUCCIÓN	33
III. HIPÓTESIS.....	34
IV. OBJETIVOS	35
V. MATERIAL Y MÉTODOS	36
1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	36
2. ALEATORIZACIÓN	36
3. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	36
4. INTERVENCIÓN DIETÉTICA.....	40
5. VISITAS Y SEGUIMIENTO.....	43
6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS Y BIOQUÍMICAS	44
7. PARÁMETROS RELACIONADOS CON ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN 45	
8. AISLAMIENTO DEL ADN DE MUESTRAS DE SANGRE.....	45
9. GENOTIPADO	45
10. PCR CUANTITATIVA Y ANÁLISIS DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS 46	
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
12. MÉTODOS DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	47

VI.	RESULTADOS	48
1.	CARACTERÍSTICAS BASALES SEGÚN GENOTIPO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN <i>SIRT1</i>	48
2.	RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO rs7069102 Y LA LONGITUD DE TELÓMEROS DURANTE LA INTERVENCIÓN.....	52
3.	RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO rs7069102 Y LOS PARÁMETROS RELACIONADOS CON ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN	52
4.	EFFECTO DE LA DIETA SOBRE LA LONGITUD DE TELÓMEROS, Y SOBRE LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO ATENDIENDO A LAS VARIANTES GENÉTICAS DEL GEN <i>SIRT1</i>	54
4.1.	PACIENTES ALEATORIZADOS A DIETA BAJA EN GRASA	54
4.2.	PACIENTES ALEATORIZADOS A DIETA MEDITERRÁNEA	56
5.	INTERACCIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO rs7069102, LA DIETA Y LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS	57
6.	RESULTADOS DE OTROS POLIMORFISMOS	58
VII.	DISCUSIÓN	60
VIII.	CONCLUSIONES	70
IX.	ABREVIATURAS.....	71
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	72

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El envejecimiento conlleva un aumento del riesgo de enfermar que si se produce de forma acelerada ocurre en edades tempranas. La evolución que muestra la longitud de los telómeros a lo largo del tiempo es un marcador del grado de envejecimiento, así como los valores de parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo.

OBJETIVOS: Identificar si existen variantes genéticas que interaccionen con la dieta y que confieran una mayor susceptibilidad al envejecimiento prematuro, reflejada en un peor perfil de evolución de la longitud de los telómeros y de parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo a lo largo de 4 años de seguimiento.

POBLACIÓN, DISEÑO Y METODOLOGÍA: Seleccionamos a los pacientes del estudio “Coronary Diet Intervention With Olive Oil and Cardiovascular Prevention” (CORDIOPREV) con determinaciones de longitud de telómeros en el momento inicial del estudio y tras 4 años de seguimiento, así como genotipado para polimorfismos en genes relacionados previamente con el envejecimiento y la longitud telomérica. Analizamos si existe una interacción significativa entre dichos polimorfismos y la dieta que siguen los pacientes (Mediterránea o baja en grasa) para determinar diferencias en la evolución de la longitud de los telómeros. Analizamos también la participación de parámetros relacionados con el estrés oxidativo y la inflamación en dicha interacción.

RESULTADOS: Encontramos que pacientes de alto riesgo cardiovascular homocigotos para el alelo G en el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs7069102 del gen *SIRT1* se benefician del consumo de una dieta sana para disminuir el acortamiento de los telómeros que se produce con el paso del tiempo frente a los pacientes que poseen el alelo C ($P=0,001$), así como para mejorar su perfil de marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo. En el estudio por dietas, los pacientes sometidos a dieta baja en grasa con genotipo GG presentan un menor acortamiento telomérico que los portadores de C ($P=0,012$) y una mejoría de la proteína C reactiva ultrasensible (PCRus) ($P=0,025$) y factor de necrosis tumoral α (TNF α) ($P=0,007$) frente a los pacientes portadores de C. Los pacientes que siguen una dieta mediterránea no muestran diferencias significativas en la evolución de la longitud de sus telómeros ni en los parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo según su genotipo para el citado polimorfismo.

CONCLUSIONES: Nuestros hallazgos demuestran que en pacientes portadores de una determinada variante genética, una dieta saludable mejora el perfil de envejecimiento, y más específicamente muestran un mejor perfil de envejecimiento los pacientes que presentan dicha variante y que siguen una dieta baja en grasa, lo que permite

personalizar la dieta en función de las variantes alélicas que posee cada sujeto, contribuyendo de esta manera a una nutrición de precisión.

II. INTRODUCCIÓN

1. ENVEJECIMIENTO

La palabra envejecimiento proviene del verbo envejecer con origen en el latín y que significa “resultado o acción de ponerse viejo”, y se define como el conjunto de cambios morfológicos y fisiológicos que se producen en un organismo como consecuencia de la acumulación de daño celular con paso del tiempo.

La Organización Mundial de la Salud ha afirmado que la mayoría de la población a nivel mundial tendrá una esperanza de vida de 60 años o más y pronostica que entre 2015 y 2050, el porcentaje de la población mayor de 60 años prácticamente se duplicará (del 12% al 22 %). Este envejecimiento poblacional provocará que aumente el número de personas con enfermedades crónicas relacionadas con la edad como el cáncer, la diabetes, los trastornos cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas (1, 2), entidades que, además del impacto sobre la salud, suponen un gran coste económico tanto para los individuos que las sufren como para la sociedad. Es por todo ello de gran importancia realizar un avance en el conocimiento de los determinantes del grado de envejecimiento biológico individual, sus marcadores y los factores que determinan su evolución.

Durante la vida adulta del ser humano tienen lugar cambios tanto a nivel celular y molecular, como a nivel de tejidos y órganos. Algunos de estos cambios son inocuos, y solo significan pequeñas variaciones en la eficacia del funcionamiento de estructuras y sistemas. Sin embargo, otros conducen a un mayor riesgo de enfermedad, discapacidad o muerte ya que producen una disminución de las funciones biológicas y de la capacidad del organismo para adaptarse al estrés metabólico y responder a los agentes nocivos a los que se enfrenta, conduciendo por tanto a una pérdida progresiva de la homeostasis. Por ello en ocasiones se utiliza el término senescencia para describir el envejecimiento entendido como el deterioro progresivo de las funciones corporales a lo largo del tiempo (3).

No existe una causa única que controle el grado de envejecimiento, o un único mecanismo fisiopatológico, sino que se ha demostrado que intervienen factores tanto biológicos como psíquicos y sociales (1, 2). Por lo tanto, debemos realizar el estudio de los mecanismos relacionados con el envejecimiento desde una aproximación multifactorial, con especial interés en los siguientes aspectos:

- Las fuentes fisiológicas del daño que provoca el envejecimiento.
- Las respuestas compensatorias que intentan restablecer la homeostasis.
- La interconexión entre los diferentes tipos de daño.
- Las posibilidades de intervenir exógenamente para retrasar el envejecimiento.

En definitiva, aunque para explicar todo este proceso disponemos de una visión clásica centrada en vías únicas y en características individuales que se ofrecía hasta hace unos años, dada su complejidad y la participación de múltiples vías interconectadas, cada vez parece más evidente que esta teoría clásica resulta insuficiente (4, 5).

Las teorías más recientes proponen que el envejecimiento no tiene una etiopatogenia simple basada en un proceso lineal, sino que depende de una red de procesos a múltiples niveles biológicos, con interconexión entre los distintos componentes implicados, cuyas principales líneas desarrollamos a continuación.

TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO:

Actualmente se tiende a abordar el envejecimiento desde una teoría unificada en la que tanto los genes y sus sistemas de mantenimiento y reparación, como el entorno y el azar determinan el proceso.

Esta teoría combina elementos de otros grupos de teorías previas, que pueden clasificarse en: teorías del envejecimiento programado o teorías de la acumulación de daños.

En cuanto a las teorías del envejecimiento programado, éstas sugieren que se producen beneficios evolutivos para una especie como consecuencia de la limitación de la vida útil de los individuos, de manera que la eliminación de los sujetos tras finalizar su edad reproductiva permite una menor competencia por los recursos y promueve la mejor adaptación de las sucesivas generaciones.

Las teorías de la acumulación de daños, por su parte, plantean que el daño oxidativo que se genera durante el metabolismo afecta al ácido desoxirribonucleico (ADN), las proteínas y los lípidos desencadenando el envejecimiento.

1.1. VÍAS BIOLÓGICAS DE ENVEJECIMIENTO CELULAR

En la búsqueda de los mecanismos implicados en el envejecimiento celular que permitan un mejor conocimiento del proceso, se han identificado una serie de factores entre los cuales se encuentran (2):

1.1.1. INESTABILIDAD GENÓMICA

Es la modificación del material genético de una célula. El daño genómico acompaña de forma fisiológica al envejecimiento, pero además su inducción artificial puede provocar envejecimiento acelerado. Diversos agentes físicos, químicos y biológicos, tanto endógenos como exógenos, pueden conducir a la inestabilidad genómica al producir mutaciones, translocaciones, ganancias y pérdidas cromosómicas, acortamiento de los telómeros y disrupción génica por integración de virus o trasposones. Estos cambios afectan tanto al ADN nuclear como al mitocondrial y también a la arquitectura nuclear. Algunos de los factores inductores de un envejecimiento acelerado vinculado a daño genómico se muestran en la tabla 1:

Físicos	Químicos	Biológicos
- Temperatura	- Agentes alquilantes	- Parásitos
- Luz ultravioleta	- Acridina	- Bacterias
- Radiaciones ionizantes	- Oxidantes	- Hongos
- Radiaciones electromagnéticas	- Agentes Redox	- Virus
	- Epóxidos alifáticos	- Agentes vegetales

Tabla 1. Disruptores génicos

En respuesta a la inestabilidad genómica, tanto la producida de forma natural como la derivada de disruptores génicos, disponemos de mecanismos capaces de minimizar estos daños. En el caso de la maquinaria que asegura una fiel segregación cromosómica, existe evidencia de que su potenciación mediante mecanismos como incrementar la expresión del gen *BubR1* (que codifica un regulador mitótico que ejerce su función en el punto de control mitótico y en las uniones entre microtúbulos y cinetocoros) puede prolongar la longevidad en los mamíferos (6).

Es interesante explorar intervenciones que refuerzan la estabilidad del genoma nuclear y mitocondrial, como la reparación del ADN, que podrían tener un impacto positivo en el envejecimiento normal. En este sentido, se han desarrollado metodologías que pretenden modular las vías de reparación del ADN mediante sistemas que permiten editar genes induciendo roturas y reparaciones dirigidas en la secuencia génica, incorporando mutaciones o reemplazando genes, como el sistema CRISPR/Cas9 (7). Y

por el contrario, con respecto al cáncer se estudian estrategias que impiden la reparación del daño que generan sobre el ADN tratamientos como la quimio y la radioterapia (8).

La degeneración de los telómeros, como parte del daño génico asociado al envejecimiento constituye el objetivo particular de esta tesis doctoral y se analizan por separado en el siguiente apartado.

1.1.2. DESGASTE DE LOS TELÓMEROS

Los telómeros son regiones particularmente susceptibles a la acumulación de daño producido sobre el material genético con el paso del tiempo (9). Como se ha comentado anteriormente, una de las teorías del envejecimiento implica que existe una senescencia programada, de tal forma que el acortamiento de telómeros sería uno de los mecanismos por los cuales el organismo programaría la degradación del ADN codificante llegado un momento biológico dado. Sin embargo, no está claro que esta degradación sea uniforme en todos los individuos, ni las consecuencias derivadas del ritmo de degradación telomérica. En este sentido, sí que se ha demostrado que cuando existe un aumento de este desgaste se acelera el envejecimiento celular en estudios en ratones, mientras que la estimulación experimental de la telomerasa (la enzima que protege la longitud de los telómeros, aumentando los mismos ante determinados estímulos), puede retrasar el envejecimiento fenotípico (10).

1.1.3. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS

Existen evidencias tanto de que el envejecimiento se acompaña de cambios epigenéticos como de que las perturbaciones epigenéticas pueden provocar síndromes progeroides en organismos modelo. Por ejemplo, la sirtuína (SIRT) 6 es una enzima epigenéticamente relevante cuya pérdida de función reduce la longevidad y cuya ganancia de función prolonga la longevidad en ratones (11, 12).

Los cambios epigenéticos implican modificación postraduccional de las histonas, alteraciones en los patrones de metilación del ADN y remodelación de la cromatina:

- Con respecto a las **modificaciones de las histonas**, el mecanismo clave ligado al envejecimiento parece ser la metilación. Todavía no está claro si las manipulaciones de las enzimas modificadoras de histonas pueden influir en el envejecimiento a través de mecanismos puramente epigenéticos, afectando a la reparación del ADN y a la estabilidad del genoma, o mediante alteraciones transcripcionales que afecten a las vías metabólicas o de señalización fuera del núcleo. Los miembros de la familia de las sirtuinas, proteínas desacetilasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y adenosín difosfato (ADP) ribosiltransferasas se han estudiado ampliamente como posibles factores antienvjecimiento, las cuales analizaremos en detalle más adelante.
- En cuanto a la relación entre la **metilación del ADN** y el envejecimiento, los primeros análisis disponibles describieron una hipometilación global asociada con la edad, pero estudios posteriores revelaron que varios loci, incluidos los correspondientes a varios genes supresores de tumores y genes diana de la familia de proteínas Polycomb (implicados en la estructuración de la cromatina), en realidad se hipermetilan con la edad (13).
- Los cambios en la arquitectura de la cromatina como la pérdida y la redistribución global de **heterocromatina** constituyen rasgos característicos del envejecimiento mediados epigenéticamente (14, 15) y pueden incidir directamente en la regulación de la longitud de los telómeros y en la estabilidad cromosómica (16, 17).
- El envejecimiento, finalmente, se asocia con un aumento en el **ruido transcripcional** (18), un fenómeno que se produce al transcribir zonas de ADN no codificante, que da lugar a transcritos mayoritariamente sin actividad funcional, y con una producción y maduración aberrante de muchos ARNm por lo que en definitiva se producen cambios en la expresión génica (19, 20).

A diferencia de las mutaciones del ADN, las alteraciones epigenéticas son, al menos teóricamente, reversibles, lo que ofrecería oportunidades para el diseño de tratamientos antienvjecimiento (21, 22).

1.1.4. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

A medida que las células y los organismos envejecen, la eficacia de la cadena respiratoria tiende a disminuir, lo que aumenta la fuga de electrones y reduce la generación de ATP (23). Por una parte, la progresiva disfunción de las mitocondrias conduce a un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) que generan daño celular global y reincide además en un todavía mayor daño mitocondrial (24), aunque las evidencias más recientes en estudios que analizan el efecto de las ERO son contradictorias, ya que parece que también podrían desencadenar señales de proliferación celular que favorezcan la supervivencia. Por ello se plantean nuevos enfoques que permitan integrar sus aspectos positivos y negativos sobre el envejecimiento (25).

Por otra parte, con respecto a la integridad mitocondrial, existen estudios que plantean que las mitocondrias disfuncionales contribuyen al envejecimiento independientemente de la producción de ERO por mecanismos como la alteración de la señalización apoptótica que puede afectar a las membranas y su permeabilidad (25).

Durante el envejecimiento celular, la fabricación de nuevos componentes mitocondriales o biogénesis mitocondrial se reduce como consecuencia entre otros del desgaste de los telómeros. En este proceso también se ha implicado a la acumulación de mutaciones y deleciones del ADN mitocondrial, la oxidación de proteínas, la desestabilización de la cadena respiratoria, o cambios en la composición lipídica de sus membranas (25).

Además, SIRT1 modula la biogénesis mitocondrial y la eliminación de mitocondrias dañadas por autofagia y SIRT 3 controla la producción de ERO, de manera que parece que las sirtuínas participan de forma clave en el control de la función mitocondrial (25).

La mitohormesis es el proceso mitocondrial por el que en respuesta a un estrés celular leve, las mitocondrias generan niveles bajos de ERO, que a su vez actúan como moléculas señalizadoras y protegen a las células de daños mayores iniciando una respuesta adaptativa, actuando como mecanismo de defensa, de manera que deficiencias mitocondriales leves pueden aumentar la esperanza de vida (26). La mitohormesis protege del envejecimiento celular al mantener el buen funcionamiento del pool de mitocondrias ya que favorece la mitofagia de las mitocondrias dañadas.

En definitiva, y como hemos repasado en este apartado, la combinación de un mayor daño celular junto a un menor recambio en las mitocondrias, debido a una menor biogénesis y una mayor destrucción puede contribuir al proceso de envejecimiento.

1.1.5. PÉRDIDA DE PROTEOSTASIS

La proteostasis u homeostasis de las proteínas es el proceso de regulación de las proteínas del organismo. El deterioro de las proteínas es irreversible en la mayoría de los casos y genera acumulación de proteínas mal plegadas, oxidadas, glicadas o ubiquitinadas tanto a nivel intracelular en forma de cuerpos de inclusión como a nivel extracelular en forma de placas amiloides. El proteasoma se encarga de la eliminación de las proteínas oxidadas y previene su aumento, pero su actividad se altera durante el envejecimiento produciendo acúmulo de estas proteínas, como ocurre en algunas enfermedades neurodegenerativas. Existe evidencia por tanto de que el envejecimiento está asociado con la alteración de la proteostasis. Esta evidencia se basa, entre otros, en estudios en los que la inducción experimental de disfunción en la proteostasis en modelos animales con moscas y ratones puede precipitar patologías asociadas con la edad mientras que intervenciones que mejoran la precisión de la traducción de ARN a proteína aumentarían la esperanza de vida en levaduras, nematodos y moscas (27-29). También se han descrito intervenciones que mejoran la proteostasis mediante manipulaciones genéticas que retrasan el envejecimiento en los mamíferos, algunos a nivel celular y otros a nivel fenotípico (30, 31).

1.1.6. DESREGULACIÓN DE LA DETECCIÓN DE NUTRIENTES

Las células disponen de sistemas para detectar la disponibilidad de nutrientes en el organismo, y estos sistemas juegan un papel importante en el envejecimiento. Las principales vías de detección de nutrientes son mamalian Target of Rapamycin (mTOR), vía de señalización de insulina (IIS) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), sirtuinas, NADH y la vía proteína cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK). En general, si hay una baja disponibilidad de nutrientes aumentan las enzimas de reparación celular y protectoras. Este mecanismo explica por qué el ayuno o la restricción calórica pueden prolongar la vida útil (32). La estimulación de menos vías de detección de nutrientes conduce a un mejor mantenimiento y reparación, lo que resulta en una extensión de la vida. La sobreestimulación de estas vías por una abundancia de alimentos, por su parte, genera una señal anabólica que acelera el envejecimiento y aumenta el riesgo de diversas enfermedades, datos que se han demostrado tanto en estudios clínicos como en estudios de funcionalidad. Así, una manipulación

farmacológica que imita un estado de disponibilidad limitada de nutrientes, como la rapamicina, puede prolongar la longevidad en ratones (33).

1.1.7. SENESCENCIA CELULAR

La senescencia celular es la detención estable del ciclo celular que ocurre como consecuencia de determinados cambios fenotípicos (34-36). En sujetos jóvenes, impide la proliferación de células dañadas de manera que favorece la homeostasis y protege contra el cáncer. En sujetos de edad avanzada, la mayor acumulación de daños y la reposición deficiente de células senescentes acaba por tener efectos nocivos que contribuyen al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades.

Además del acortamiento telomérico, existen otros estímulos asociados al envejecimiento que desencadenan la senescencia, como el daño del ADN no telomérico y la desrepresión del locus *INK4/ARF*. La actividad del citado locus es reprimir la diferenciación y replicación celular. En sujetos jóvenes, está reprimido, por lo que se favorece el recambio celular ante los estímulos fisiológicos, pero a medida que el sujeto envejece, empieza a activarse. Una hipótesis es que el locus *INK4/ARF* puede haber evolucionado para restringir fisiológicamente las capacidades de autorrenovación y el número de células madre y progenitoras, con la consiguiente consecuencia de limitar la capacidad regenerativa de los tejidos, especialmente a medida que los animales envejecen (2).

Se ha comprobado asimismo que las células senescentes presentan alteraciones en la expresión de proteínas de manera que se produce un aumento de citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas denominado “fenotipo secretor asociado a la senescencia” (36, 37). Se trata de un secretoma proinflamatorio que puede contribuir también al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades.

Intervenciones que favorecen la eliminación de células senescentes mejoran la esperanza de vida en ratones (38).

En conclusión, la senescencia celular tiene aspectos beneficiosos como respuesta compensatoria al daño celular, pero acelera el envejecimiento cuando los tejidos agotan su capacidad regenerativa. Además, existen enfermedades que se producen por la acumulación de células senescentes.

1.1.8. AGOTAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE

Durante el envejecimiento disminuye el potencial regenerativo de los tejidos como consecuencia de múltiples tipos de daño, como son la acumulación de daños en el ADN, la sobreexpresión de proteínas inhibidoras como p16INK4a y el acortamiento de los telómeros.

Esto genera fenómenos como la inmunosenescencia cuando ocurre en las células hematopoyéticas, pero también afecta al cerebro, el músculo y el hueso entre otros.

Recientes estudios sugieren que el rejuvenecimiento de células madre puede revertir el fenotipo de envejecimiento (22).

Otro aspecto interesante es la plasticidad inducida por lesiones, que consiste en que en tejidos dañados, células no madre se desdiferencian reactivando programas de transcripción que les confieren capacidad para reparar dichos tejidos (39, 40). Esta capacidad se ve reducida durante el envejecimiento.

En el mismo sentido, la reprogramación de células somáticas adultas hacia células embrionarias pluripotenciales inducida externamente en ratones permite mejorar los marcadores celulares de envejecimiento (41-43).

1.1.9. COMUNICACIÓN INTERCELULAR ALTERADA

Durante el envejecimiento se producen cambios a nivel de la comunicación intercelular, ya sea endocrina, neuroendocrina o neuronal (44-46), de manera que la señalización neurohormonal se altera (p. ej., señalización de renina-angiotensina, adrenérgica, insulina-IGF1) a medida que aumentan las reacciones inflamatorias, disminuye la inmunovigilancia contra patógenos y células premalignas, y cambia la composición del entorno pericelular y extracelular.

1.1.10. ALTERACIONES DE LA AUTOFAGIA

La autofagia es el proceso natural de reciclado de células mediante la inclusión de material citoplasmático en vesículas que se fusionan con los lisosomas para su digestión. Afecta tanto a proteínas como a macromoléculas no proteicas, a orgánulos completos y a patógenos intracelulares. Permite proteger al organismo reduciendo el

número de células con acumulación de daños y contribuyendo a mantener la homeostasis, aunque en situaciones hostiles el proceso puede sobreactivarse produciendo un exceso de muerte celular, y provocando enfermedades derivadas de este exceso de destrucción celular. La autofagia regula también aspectos relacionados con el envejecimiento, como la reparación del ADN, la detección/metabolismo de nutrientes y la eliminación de proteínas involucradas en la inflamación (47). Con la edad se produce una disminución de la autofagia que conduce a una aceleración del envejecimiento, y estudios recientes con modificaciones genéticas que inhiben (48) o estimulan (49) la autofagia en organismos modelo redundan en esta afirmación.

1.1.11.ALTERACIONES DEL MICROBIOMA

En el envejecimiento se producen cambios en las poblaciones microbianas y pérdida de la diversidad de especies. Junto con la pérdida de la integridad estructural del intestino y otras barreras (p. ej., la barrera hematoencefálica) asociada a la edad, el cambio en las poblaciones microbianas puede provocar inflamación, alteración en la dinámica fisiológica del paso de nutrientes y antígenos procedentes del intestino, etc (24, 50).

1.1.12.INFLAMACIÓN CRÓNICA

La inflamación está implicada en una amplia gama de enfermedades relacionadas con la edad (51). El envejecimiento se correlaciona con niveles altos de mediadores inflamatorios en la sangre, como interleucinas (IL) 1 y 6, PCRus, interferón alfa (IFN α) y varios otros (52). Se produce como consecuencia del resto de vías de envejecimiento citadas previamente. Tiene una gran contribución al proceso de envejecimiento y se relaciona también con la senescencia celular y la microbiota (53).

1.1.13.OTROS FACTORES

- **ALTERACION DE PROPIEDADES MECÁNICAS:** Con el envejecimiento se producen cambios en la dinámica mecánica tanto en las células como en el medio extracelular. Por ejemplo, se producen cambios en la motilidad de las células del sistema inmune, cambios en el nucleoesqueleto que desestabilizan

la membrana nuclear, y alteraciones a nivel de la matriz extracelular que modifican la elasticidad aumentando la rigidez de las estructuras (1).

- **DESREGULACIÓN DEL PROCESAMIENTO DEL ARN:** la poliadenilación alternativa de ARNm contribuye al cáncer (54), se altera con el envejecimiento y puede contribuir a la senescencia (55).

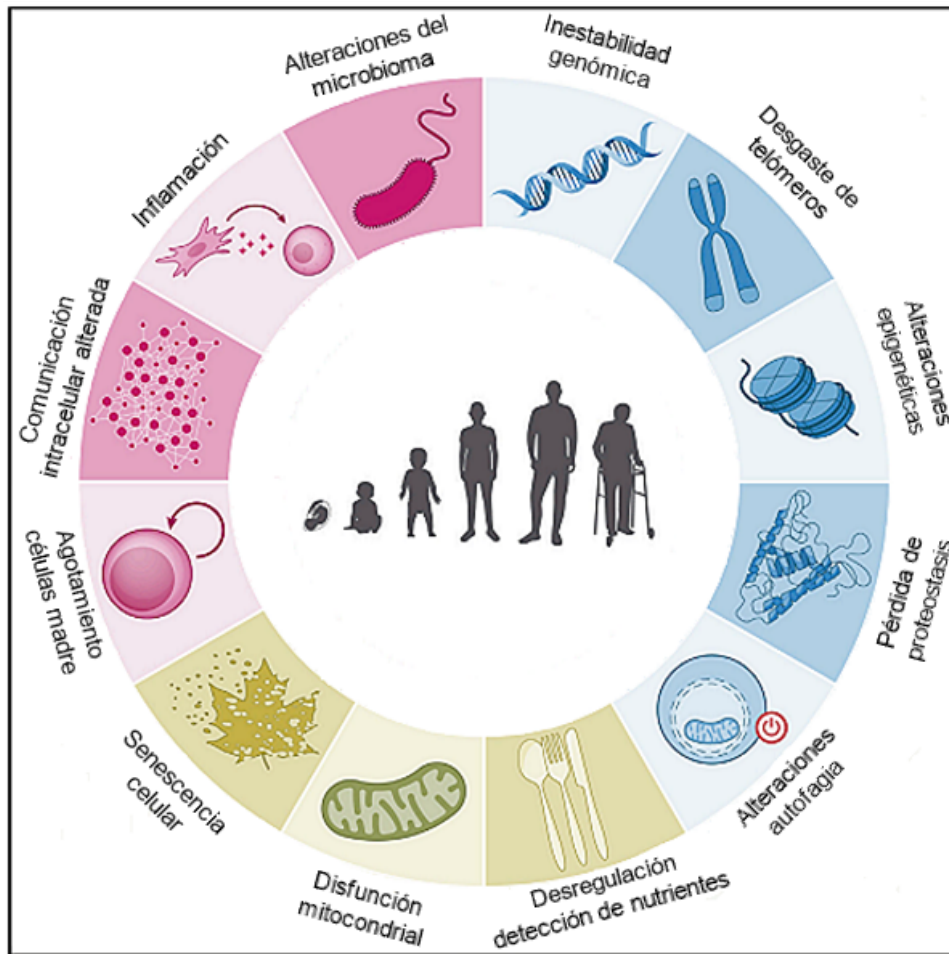


Figura 1. Mecanismos celulares subyacentes al envejecimiento. Adaptada de López-Otin, C (25).

1.2. BIOMARCADORES DE ENVEJECIMIENTO

Existen diversas formas de medir el grado de envejecimiento individual:

1.2.1. CAPACIDAD FÍSICA Y PRUEBAS ANTROPOMÉTRICAS

Las medidas de la capacidad física consisten en evaluar las condiciones individuales. Las más utilizadas son la fuerza de prensión, la velocidad de la marcha, el tiempo que un individuo tarda en levantarse de una silla, y la prueba de 6 minutos marcha. Estos parámetros se relacionan con las tasas de mortalidad independientemente de la edad (56-58).

El envejecimiento y el riesgo de mortalidad también se asocian con cambios en la composición corporal, como el aumento de la grasa corporal, la reducción de la masa muscular, la reducción de la masa de los órganos (con la excepción del corazón) y del índice de masa corporal (IMC) (59-61).

Para la valoración de estos parámetros antropométricos se pueden aplicar técnicas de imagen como la tomografía computarizada o la resonancia magnética.

1.2.2. PARÁMETROS ANALÍTICOS

Dentro de los cambios fisiopatológicos asociados con el envejecimiento, los más destacados son los que están relacionados con la función cardiovascular, el metabolismo de la glucosa, la inflamación, el estado endocrinológico-nutricional y hematológico, aunque existen escasos datos que permitan identificar con precisión el valor predictivo de estos marcadores.

- **LÍPIDOS:** El perfil lipídico es predictor de morbi-mortalidad. De hecho, algunas fracciones como el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) son agentes causales de arteriosclerosis (62, 63). Durante el envejecimiento se produce una tendencia al sedentarismo que sobrepasa la reducción de la ingesta calórica. Este hecho provoca algunos cambios en el perfil lipídico, especialmente en el metabolismo de los triglicéridos (TG), aunque no se conoce con seguridad la proporción en que estos cambios son debidos al propio envejecimiento, o a cambios en el comportamiento y los datos antropométricos de la persona (64).
- **INFLAMACIÓN:** Los marcadores de inflamación guardan relación con la edad y con el estado funcional de los ancianos, destacando los aumentos en la IL-6, el IL-1 β , el TNF- α y la PCRus (65-67) que, sin embargo, se encuentran en niveles más bajos en personas centenarias. Por el contrario,

algunas citocinas con efecto antiinflamatorio se encuentran aumentadas en ancianos, como la IL-10 (68). De esta manera, parece que un perfil de parámetros inflamatorios favorable se relaciona con la longevidad extrema.

- OTROS: Con la edad se produce una alteración de la tolerancia a la glucosa, cambios en la serie roja, hormonales (desde hormonas tiroideas y sexuales hasta reguladoras del apetito como la adiponectina, grelina, leptina, visfatina) y en parámetros nutricionales, aunque a este nivel los estudios disponibles se centran en el análisis de los micronutrientes (69). También resultan interesantes los marcadores cardiacos, como la fracción N-terminal del propéptido natriurético cerebral (NT-proBNP) y la troponina. Además de su utilidad como predictores de daño cardiaco y de la mortalidad relacionada con él, aumentan con la edad hasta edades muy avanzadas.

1.2.3. MOLECULARES/ADN

Como hemos comentado anteriormente, está demostrada la relación entre la edad y la acumulación de ERO, el daño en el ADN, la disfunción mitocondrial, el deterioro de las defensas antioxidantes y el acortamiento de los telómeros (70).

Sin embargo, también hay evidencias que indican que este tipo de parámetros aumentan hasta cierta edad, coincidiendo con la esperanza de vida media, pero a edades posteriores se produce una estabilización en meseta de sus valores o incluso una disminución en el nivel de algunos de estos biomarcadores.

De esta manera, en las personas con longevidad extrema se aplican con menor seguridad las teorías tradicionales del envejecimiento con respecto a la acumulación de daños en el ADN, la inestabilidad del genoma y el acortamiento de los telómeros relacionados con la edad, al presentar una mejor capacidad de reparación del ADN y una mayor actividad de la telomerasa, incluso comparable a cohortes mucho más jóvenes, lo que podría ser la causa de su mayor longevidad. Se desconoce si esta resistencia al envejecimiento se debe a factores hereditarios o a un estilo de vida saludable, por lo que éste sigue siendo un campo interesante para futuras investigaciones.

1.2.4. OTROS MARCADORES EN INVESTIGACIÓN

- Los niveles de bilirrubina y los de productos finales de glicación avanzada son biomarcadores que podrían permitir identificar el envejecimiento saludable y la resistencia a las enfermedades crónicas.
- El “reloj epigenético” es un estimador multivariante de la edad cronológica basado en los niveles de metilación del ADN de 353 marcadores de dinucleótidos conocidos como guaninas fosfato de citosina (CpG). La extensión y los patrones de CpG se asocian de forma independiente con la edad cronológica y la mortalidad (71), pero son necesarios más estudios que permitan comprender si existe una relación causal subyacente a la asociación encontrada.
- La expresión del gen *p16INK4a*, promotor de senescencia celular, conduce a un proceso de detención irreversible del ciclo celular y la pérdida de la capacidad regenerativa. La concentración de la proteína p16ink4a aumenta con el envejecimiento. Su regulación precisa es importante para la homeostasis tisular, manteniendo el equilibrio entre la supresión tumoral y el envejecimiento (72). Hasta el momento, sin embargo, no se han realizado estudios en poblaciones humanas y en diferentes tipos de células para proporcionar evidencia de su potencial como biomarcador del envejecimiento saludable.
- Los microARN (miARN), moléculas de ARN monocatenario y no codificante de 21 a 23 nucleótidos que regulan un amplio espectro de actividades biológicas, se han propuesto también como señales de envejecimiento. Son moléculas estables incluso en suero y/o plasma, por lo que se consideran marcadores prometedores en el entorno clínico. Algunos de los miARN candidatos con mayor potencial son miR-146, miR-155, miR-21 y miR-126. Es necesario realizar más investigaciones para evaluar mejor su potencial y su capacidad para distinguir si se está produciendo un envejecimiento saludable (69).

1.3. ENVEJECIMIENTO CELULAR

Como comentamos, muchos factores diferentes están involucrados en el envejecimiento celular, como el aumento del estrés oxidativo y la inflamación, lo que impacta en la funcionalidad de las moléculas o estructuras relacionadas con el envejecimiento, como la longitud de los telómeros, entre otros.

Resultados previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que una baja ingesta de vitamina E acelera el envejecimiento celular en pacientes con enfermedades cardiovasculares (73). Esto sugiere la necesidad de centrar los estudios en la identificación de pacientes con riesgo de envejecimiento no saludable para tomar medidas más efectivas destinadas a retrasar o ralentizar el proceso de envejecimiento y, por lo tanto, reducir la probabilidad de desarrollar enfermedades relacionadas con él.

1.3.1. EVIDENCIAS DE LOS TELÓMEROS COMO MARCADOR

Los telómeros, localizados en los extremos finales de los cromosomas, son estructuras proteicas de ADN que protegen la parte final de los cromosomas, frente a procesos como reordenamientos y fusiones que favorecerían la inestabilidad del material genético de manera que juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad del genoma. Estas estructuras por tanto protegen el material genético de su degradación mejorando la estabilidad cromosómica en las sucesivas replicaciones. Tienen unas características particulares que resultan interesantes y son sujeto de estudio e investigación por sus diversas implicaciones clínicas.

Estructuralmente, los telómeros son regiones no codificantes de entre 5000 y 15000 pares de bases de longitud compuestas por secuencias repetitivas de 6 pares de bases (TTAGGG), añadidas por la enzima telomerasa.

Tras el descubrimiento de la estructura del ADN y su replicación por las ADN polimerasas, dependientes de cebadores preformados para iniciar el proceso de replicación del material genético, suscitó controversia el proceso de síntesis de las regiones finales de los cromosomas de estructura lineal, lo que se conoce como problema de la replicación final ya que en cada ciclo de replicación celular se pierden entre 50 y 250 nucleótidos. En las sucesivas replicaciones celulares, la pérdida de las regiones terminales conduciría a una reducción del material genético y de esta manera a una limitación en el número de divisiones celulares posibles.

La enzima telomerasa es una transcriptasa inversa que contiene un molde de ARN que reconoce la región telomérica y permite el inicio de la replicación para evitar así la pérdida de material genético en las sucesivas divisiones.

Algunas células (reproductivas y células madre) son capaces de activar la enzima telomerasa que permite mantener la integridad de los telómeros. En las células con déficit de función de la telomerasa como ocurre con las células somáticas, los telómeros

se acortan en cada división mitótica y de esta manera las células envejecen. El agotamiento de los telómeros explica la limitada capacidad proliferativa de algunos tipos de células cultivadas in vitro, la llamada senescencia replicativa o límite de Hayflick (74). Cuando la longitud de los telómeros alcanza un nivel mínimo se produce la senescencia replicativa que puede conducir a la apoptosis. En células tumorales, sin embargo, se detecta una actividad de la telomerasa incrementada, proceso necesario para la alta tasa replicativa presente en esta enfermedad. La senescencia celular y la apoptosis son mecanismos por tanto importantes no solamente para evitar la replicación inefectiva en individuos de edad avanzada, sino también para evitar el desarrollo de tumores.

Por tanto, el acortamiento de los telómeros es conocido no solo como un marcador del envejecimiento celular sino también como un mecanismo con importantes consecuencias funcionales, pero no es el único factor que marca el destino celular. La presencia de telomerasa que impide el acortamiento de los telómeros es otro factor importante. Y no solo juega un papel importante en el envejecimiento celular sino también en las enfermedades asociadas.

El acortamiento y las anomalías en los telómeros que conducen a la inestabilidad cromosómica favorecen la aparición de diversos procesos como son la aterosclerosis, la diabetes mellitus, el cáncer y diversos síndromes hereditarios; que determinan la esperanza de vida y la mortalidad. En nuestro medio, la aterosclerosis y el cáncer son dos de las principales causas de mortalidad, y ambas parecen estar relacionadas con la alteración de la homeostasis de los telómeros.

Algunos estudios ponen de manifiesto que la longitud de los telómeros no está determinada solo por la pérdida de bases durante los sucesivos ciclos de replicación celular sino que también se ve influenciada por factores no modificables como son los hereditarios (75), la raza y el sexo (son más cortos en hijos sanos de enfermos con coronariopatía, y más largos en africanos y americanos frente a europeos y asiáticos y en mujeres), y por la exposición a los factores de riesgo conocidos para la aterosclerosis (tabaquismo, obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2).

Los efectos del estrés en estas estructuras y en la posterior senescencia prematura siguen sin estar claros. Un modelo propuesto es que el estrés oxidativo induce la senescencia prematura a través del acortamiento de los telómeros (1).

Para estudiar los efectos del acortamiento sobre la replicación celular, se han realizado estudios en líneas celulares inmortalizadas (células modificadas genéticamente para

poder replicarse de forma cuasi indefinida) en las que la inducción de un estrés oxidativo crónico en forma de 8-oxoguanina produjo un acortamiento de los telómeros, y seguidamente una detención del crecimiento e inestabilidad genómica, mientras que el estrés oxidativo agudo (que no produjo acortamiento telomérico) mostró poco efecto en la replicación (76).

Otros estudios muestran por el contrario que una sola dosis de estrés oxidativo en los telómeros fue suficiente para inhibir el crecimiento celular e inducir la senescencia prematura, que no estuvo acompañada de un acortamiento de los telómeros, sino más bien de fragilidad a dicho nivel. Los telómeros eran además hipersensibles al estrés de replicación causado por la 8-oxoguanina, y se planteó la hipótesis de que el estancamiento de la replicación podría explicar la detención del crecimiento celular y la senescencia prematura (77).

La abundancia o porcentaje de telómeros críticamente cortos es otro parámetro de importancia en relación con el proceso de envejecimiento que se ha propuesto como un mejor indicador de disfunción telomérica (y en consecuencia celular y tisular) que la longitud media de los telómeros por lo que se plantea que su medición también será de gran utilidad para valorar el grado de envejecimiento, aunque por el momento los estudios en humanos suelen centrarse en la medición de la longitud media de los telómeros. En este sentido, se han publicado ya algunos estudios que relacionan el porcentaje de células con telómeros cortos o la abundancia de telómero cortos por núcleo con el deterioro cognitivo y con trastornos del ánimo. Según esta teoría, la disfunción tisular se debe a la acumulación de células senescentes (apoptóticas) con telómeros críticamente cortos en los tejidos lo que junto con la pérdida de reservas de células madre los conduce a ser ineficientes (78).

1.3.2. FORMAS DE MEDIR LOS TELÓMEROS

La importancia de la medición de los telómeros para valorar el grado de envejecimiento radica en el interés de comparar a un determinado individuo con otros de su misma edad y género, o bien en comprar los datos de un mismo individuo a lo largo del tiempo. La elección de un método de medida u otro depende del objetivo del estudio a realizar, pero también de la cantidad y tipo de muestras de las que se dispone (células vivas o no).

Los métodos más empleados en la actualidad para medir la longitud de los telómeros son:

Análisis de fragmentos de restricción terminal (TRF): Los estudios de longitud de telómeros se basaron inicialmente en este método de cuantificación (79). Para su determinación, las muestras de ADN genómico son digeridas con enzimas de restricción, de manera que se escinden las repeticiones del telómero y algún ADN subtelomérico. Posteriormente se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, se transfieren a una membrana de filtro y se hibridan con sondas de oligonucleótidos marcadas con quimioluminiscencia o radioactividad para visualizar fragmentos de restricción de telómeros. Este método requiere mayor cantidad de ADN que otras técnicas, pero permite medir la distribución de la longitud de telómeros de una población de células y se expresa en kilobases absolutas. Proporciona una estimación aproximada del número medio de repeticiones teloméricas por muestra, incluyendo cantidades variables de secuencias subteloméricas. A pesar de sus limitaciones, el uso del análisis TRF fue fundamental para revelar las primeras asociaciones de la longitud de los telómeros con el envejecimiento y las enfermedades humanas y sigue siendo uno de los métodos más utilizados para el análisis de la longitud de los telómeros.

Hibridación in situ por fluorescencia telomérica (FISH): Este método aumenta la precisión y supone un gran avance para la cuantificación de la longitud de los telómeros (80). El primer método basado en FISH desarrollado para medición de telómeros fue el llamado método FISH cuantitativo de telómeros o Q-FISH en metafases (también conocido como Q-FISH convencional), que permite la cuantificación de la longitud de los telómeros de los extremos cromosómicos individuales a nivel de una sola célula, proporcionando una cuantificación de la abundancia de telómeros muy cortos y también de la longitud media de los telómeros por célula. Hasta la fecha, Q-FISH en metafases sigue siendo uno de los métodos más precisos y sensibles disponibles para medir telómeros individuales por núcleo en una población celular. Requiere mucho tiempo y mano de obra y, por lo tanto, no es adecuado para ensayos de alto rendimiento. En este sentido, posteriormente se desarrolló un método Q-FISH de telómeros de rendimiento medio basado en citometría de flujo, conocido como Flow-FISH, metodología que solo proporciona valores de longitud media de los telómeros por célula y, por lo tanto, es menos precisa que la Q-FISH convencional (81). Más recientemente, se ha desarrollado una plataforma FISH cuantitativa de telómeros automatizada, llamada FISH cuantitativo HT (HT Q-FISH), que permite la cuantificación de alto rendimiento tanto de la longitud media de los telómeros como del porcentaje de telómeros cortos por célula en grandes estudios de población humana (82).

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de telómeros (qPCR) no requiere células vivas y es rápida y de alto rendimiento (83). Mide las señales de los telómeros (T) y las señales del gen de una sola copia (S), en comparación con un ADN de referencia, para producir relaciones T/S relativas que son proporcionales a la longitud promedio de los telómeros. Como inconvenientes, no puede proporcionar valores absolutos de longitud de los telómeros en kilobases, solo proporciona valores medios de longitud de telómeros por muestra y no permite la cuantificación de la abundancia o porcentaje de telómeros cortos. Estas limitaciones han sido eludidas por un método basado en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) conocido como análisis de telómero único (STELA), que permite medir los telómeros cortos ya que se realiza una cuantificación individual mediante cebadores específicos de cromosomas, pero no es aplicable en estudios con una población amplia debido a que la técnica requiere de mucho personal para su realización.

Otros métodos de aparición más reciente (78):

- Ensayos de hibridación: son varios tipos de métodos cuantitativos basados en la hibridación de un trazador colorimétrico con fragmentos de los telómeros que evitan la cuantificación de secuencias subteloméricas pero que solo proporcionan información sobre la longitud media en poblaciones celulares, pero no en telómeros o células individuales.
- Reacción de etiquetado cebado in situ: se trata de una cuantificación de telómeros individuales mediante hibridación de oligonucleótidos sintéticos con secuencias de ácidos nucleicos que permite medir la abundancia de telómeros críticamente cortos y requiere de células vivas.

2. NUTRICIÓN

2.1. RELACIÓN DIETA-ENVEJECIMIENTO CELULAR

Un estilo de vida saludable, que incluye la dieta, mejora el estado de estrés oxidativo e inflamatorio y favorece el mantenimiento de la longitud de los telómeros, mientras que la adherencia a un estilo de vida poco saludable tiene el efecto contrario (84).

Entre las dietas saludables que se han relacionado con una mejora en los cambios relacionados con la edad se encuentran la dieta mediterránea (85-87) y los patrones dietéticos bajos en grasas (88-90).

2.1.1. ESTUDIOS

Existen diversos patrones dietéticos saludables asociados con un riesgo reducido de enfermedad cardiovascular, entre otras enfermedades asociadas con la edad, como son la dieta mediterránea tradicional, la dieta Okinawa la dieta denominada como DASH (enfoques alimentarios para detener la hipertensión) y la dieta Portfolio (91). En general, las principales características compartidas entre estos patrones dietéticos incluyen: alto consumo de carbohidratos sin refinar, consumo moderado de proteínas utilizando como fuentes verduras/legumbres, pescado y carnes magras, y un perfil de grasas saludables (más alto en grasas mono/poliinsaturadas, más bajo en grasas saturadas; rico en omega-3). La ingesta de grasas saludables es probablemente un mecanismo para reducir la inflamación, optimizar el colesterol y otros factores de riesgo. Además, la menor densidad calórica de las dietas ricas en productos de origen vegetal conlleva una menor ingesta calórica junto con una alta ingesta de fitonutrientes y antioxidantes. De esta manera contribuyen a una disminución de la inflamación y el estrés oxidativo, modulando el envejecimiento y reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas asociadas con la edad de manera que promueven el envejecimiento saludable y la longevidad.

Por otra parte, la relación entre una dieta rica en energía y pobre en nutrientes, como ocurre con el patrón dietético occidental, un estilo de vida sedentario y un mayor riesgo de enfermedades crónicas ha sido bien establecida en diversos estudios (92-95). Este patrón dietético se caracteriza por una alta densidad calórica, un alto consumo de carne rica en grasas saturadas (especialmente carnes rojas y procesadas), un bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-6:n-3, un alto consumo de carbohidratos refinados, y un bajo consumo de frutas, verduras, fibra y fitonutrientes.

Un estudio llevado a cabo por Trichopoulou et al. demostró que un patrón dietético basado en la Dieta Mediterránea tiene efectos positivos sobre la esperanza de vida, reduciendo significativamente la mortalidad (96). Evidencia adicional confirmó la asociación entre el estilo de vida en individuos de edades medias y el envejecimiento saludable, previniendo la aparición de discapacidad, fragilidad y otras enfermedades no transmisibles, incluido el cáncer y la demencia (97).

El estudio EPIC examinó la asociación entre la adherencia al patrón de Dieta Mediterránea mediante el cuestionario Mediterranean Diet Score (MDS) y la esperanza de vida entre 74.607 hombres y mujeres mayores de nueve países europeos. Los autores demostraron que para un aumento de dos unidades en el MDS modificado, se observó una reducción del 8 % (IC del 95 %: 3 % a 12 %) de la mortalidad por todas las causas (98).

Entre las vías celulares implicadas en los efectos de la Dieta Mediterránea se han identificado numerosos procesos celulares interconectados, tanto en la carcinogénesis como en las respuestas inflamatorias, en la producción de radicales libres, y en la expresión de citoquinas inflamatorias, por ejemplo, a través de la regulación a la baja de la expresión génica del factor de transcripción NF-κB (99).

La Dieta Mediterránea también puede tener un impacto positivo en el llamado “inflammaging” o envejecimiento por inflamación a través del mecanismo epigenético (que incluye la remodelación de la cromatina, la metilación del ADN y los miARN) o a través de la preservación de la homeostasis de la microbiota intestinal (100).

Se ha encontrado una asociación positiva entre un estilo de Dieta Mediterránea y la longitud de los telómeros en diversos metaanálisis de estudios transversales, aunque no existen actualmente evidencias de relación causal (101).

Diferentes mecanismos subyacentes podrían explicar esta asociación. Algunos alimentos clave de este tipo de dieta, como las verduras, las frutas, el aceite de oliva, las nueces y el vino, son especialmente ricos en componentes antioxidantes y antiinflamatorios que se han implicado en el mantenimiento de la longitud telomérica. Su consumo se ha asociado con una mejoría en varios biomarcadores inflamatorios y de estrés oxidativo de manera que la Dieta Mediterránea puede influir positivamente en el acortamiento de los telómeros. Los efectos protectores sobre dicha longitud y el riesgo de enfermedad podrían deberse a cada uno de los componentes individuales de la dieta o de la combinación de todos ellos (102).

Un estudio realizado por Meinilä et al. de cohorte prospectivo, evaluó la asociación entre la adherencia a la Dieta Mediterránea, medida con la puntuación de Trichopoulou, y la longitud de los telómeros. Este estudio mostró que, después de 10 años de seguimiento en 456 hombres, la adherencia a la dieta no se asoció con el cambio de longitud. En cambio, si se asoció con un acortamiento más rápido en 590 mujeres después de 10 años de seguimiento (103).

Sin embargo, otro análisis realizado en pacientes con alto riesgo cardiovascular ha evaluado el efecto de este tipo de dieta sobre el acortamiento de los telómeros después de 5 años de seguimiento no encontrando diferencias en cuanto a LT entre los pacientes que seguían una DM complementada con aceite de oliva comparados con los que seguían una dieta baja en grasas. No obstante, la dieta mediterránea complementada con frutos secos pareció tener un efecto perjudicial sobre el acortamiento de los telómeros (104).

3. GENÉTICA

Tanto en el envejecimiento como en las enfermedades relacionadas con la edad existe un componente genético de manera que se ha demostrado que diversos SNP están asociados con procesos relacionados con el desarrollo de estas enfermedades (105-107).

Estudios llevados a cabo por Finch, Sapolsky y Stanford han demostrado que la interacción entre la dieta y el genotipo juega un papel importante en la longevidad humana (108).

En las últimas décadas se han identificado muchos genes asociados a la esperanza de vida en diferentes especies. Entre los más destacados podemos encontrar los siguientes (109):

- *APOE*: es el gen que codifica la Apolipoproteína E, la cual se une a las moléculas de lípidos para producir lipoproteínas. Es un gen pleotrópico que contribuye al empaquetamiento y transporte de grasas y colesterol en el torrente sanguíneo, al mantenimiento de la glucemia, la homeostasis de las células neuronales, la fisiología suprarrenal y cerebral y la salud cardiovascular. Hay tres alelos ampliamente estudiados del gen *APOE*: e2, e3 y e4 que codifican las proteínas Apo E2, E3 y E4. Está demostrada la relación de *APOE* con la mortalidad humana. Los estudios sobre poblaciones europeas han demostrado una contribución del gen *APOE* de hasta un 3,5 % en la esperanza de vida, de manera que las poblaciones con alta frecuencia del alelo e4 tienen una esperanza de vida aproximadamente 4,2 años más corta, así como telómeros también más cortos.

- *p53*: es un gen que codifica la proteína reguladora del ciclo celular responsable de mantener la estabilidad del genoma, reducir la tasa de mutación y suprimir el cáncer. Existe una fuerte evidencia de que *p53* tiene un papel complejo en la regulación de la longevidad de la vida en ratones, moscas, *Caenorhabditis elegans* y humanos. Se piensa que el mecanismo subyacente a esta asociación es que el daño del ADN se considera uno de los principales mecanismos de envejecimiento, y el gen *p53* es uno de los principales responsables en mantener la integridad del ADN. Datos en otros mamíferos también apoyan esta teoría. Por ejemplo, en el genoma de elefantes se ha identificado que existen de 12 a 20 copias del gen *p53* que están destinadas a reducir las posibilidades de cáncer y daño en el ADN.
- Vías *DAF-16/FOXO*: *DAF-16* es un gen ortólogo (se denominan genes ortólogos a aquellos genes que presentan homología en dos especies distintas por tener un origen ancestral común) que codifica proteínas FoxO o factores de transcripción de caja de cabeza de horquilla de clase O, que regulan los niveles de expresión de genes asociados con el metabolismo, el estrés oxidativo, el envejecimiento y la inmunidad. *DAF-16/FOXO* actúa como un punto de unión para diferentes vías de señalización que conducen a la longevidad y la regulación del estrés metabólico.
- *TERT/TERC*: codifican el componente proteico (TERT) y de ARN (TERC) de la telomerasa, que forman el núcleo catalítico de la enzima. El componente de ARN proporciona la plantilla para la síntesis de nuevas repeticiones, mientras que el componente proteico actúa como una transcriptasa inversa que añade nuevas repeticiones teloméricas en base a dicha plantilla. Han sido identificadas variantes alélicas en varios SNP de dichos genes que confieren diferente susceptibilidad al envejecimiento y que se asocian con la longevidad.
- *PINX1*: regula la actividad de la telomerasa.
- *TOMM40*: codifica proteínas de la membrana mitocondrial.
- *COQ*: regulan la coenzima Q, que participa en la producción energética a nivel de la cadena de transporte de electrones y tiene efecto antioxidante por su capacidad para adquirir formas reducidas y oxidadas.

- *ADIPOQ*: regula la adiponectina, implicada en el metabolismo energético y la sensibilidad a la insulina.
- *SIRT*:

Las sirtuinas o deacetilasas de histonas clase III (HDAC) son proteínas deacetilasas/ADP ribosil transferasas. Son enzimas dependientes de nicotinamida adenina dinucleotido (NAD⁺) que intervienen en procesos a nivel del núcleo, el citoplasma y la mitocondria produciendo modificaciones post traduccionales o ADP ribosilación del ADN. Participan en la regulación del metabolismo energético, la formación de heterocromatina, la segregación cromosómica, la diferenciación celular, la apoptosis, la transcripción (por silenciamiento) y regulación de genes, y la reparación y recombinación del ADN por lo que están relacionadas con la longevidad al controlar la senescencia celular (110). También intervienen en la respuesta al estrés, asegurando que las mutaciones no se acumulen (111). Actúan sobre las histonas como se detalla más adelante, pero también tienen sustratos diferentes a las histonas por lo que participan en otros procesos fisiológicos (112).

Las histonas son moléculas que mantienen la estructura de la secuencia genética, y su disfunción puede estar asociada al daño celular, la senescencia o el envejecimiento celular (110). La acetilación de las histonas, que ocurre de forma frecuente, reduce su capacidad para unirse al ADN y favorece que la cromatina esté transcripcionalmente activa. La desacetilación de las histonas llevada a cabo por las sirtuinas favorece de esta manera que se mantengan unidas al ADN impidiendo la transcripción, por lo que regulan la expresión génica y mejoran la estabilidad genómica.

Desempeñan un papel importante en la prevención del estrés oxidativo y la inflamación (111) y están presentes en diversas localizaciones intracelulares de diferentes tejidos (hígado, tejido adiposo, endotelio, etc.). Su funcionalidad está regulada por factores externos como la dieta (113, 114), entre otros. Por esta razón, estudios previos se han centrado en la regulación por sirtuinas del proceso de envejecimiento y el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad (115, 116). El gen *SIRT1* codifica la proteína Sirt1, que tiene una variedad de funciones moleculares y es en una proteína importante en el envejecimiento y la regulación metabólica (117). Durante la última década, los estudios han sugerido una correlación entre la actividad de Sirt1 y las enfermedades asociadas con el envejecimiento, como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y los trastornos neurodegenerativos (118). Los SNP rs7069102 y rs1885472 son dos SNP de alto desequilibrio de ligamiento (LD) ubicados en la secuencia del gen. En un estudio previo con personas sanas, el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular

se asoció con el genotipo rs7069102, lo que apunta a la relación entre ese polimorfismo y la enfermedad cardiovascular.

El interés en esta familia de proteínas en relación con el envejecimiento proviene de una serie de estudios en levaduras, moscas y gusanos, que demostraron que el único gen de sirtuinas presente en estos organismos, llamado *Sir2*, actuaba promoviendo la longevidad (2). Se demostró por primera vez que la sobreexpresión de *Sir2* prolonga la vida replicativa en *Saccharomyces cerevisiae* y resultados posteriores indicaron que inducir la expresión de sus genes ortólogos en el gusano (*sir-2.1*) y la mosca (*dSir2*) podría extender la vida útil en ambos invertebrados (119). Aunque estos hallazgos han sido posteriormente cuestionados (120), otros estudios posteriores indican que la sobreexpresión de *sir-2.1* da como resultado una modesta extensión de la vida útil en *C. elegans* (121).

Con respecto a los mamíferos, varios parálogos (los genes parálogos son genes homólogos cuyo origen se encuentran dentro del genoma de una especie por lo que uno de ellos ha aparecido por duplicación del otro) de sirtuinas pueden influenciar aspectos del envejecimiento en ratones (122). En particular, la sobreexpresión transgénica de *SIRT1* de mamíferos, que es el homólogo más cercano a *Sir2* de invertebrados, mejora aspectos de la salud durante el envejecimiento, pero no hay datos de que aumente directamente la longevidad (123).

SIRT1 es responsable de la desacetilación de la proteína p53 supresora de tumores, NF-κB y Ku70 (factor de reparación del ADN). También regula la familia de factores de transcripción FOXO y STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) y es la isoenzima SIRT mejor estudiada (109).

Con respecto a las evidencias disponibles para *SIRT 6* en mamíferos, parece que regula la estabilidad genómica, la señalización de NF-κB y la homeostasis de la glucosa a través de la desacetilación de la histona H3K9 (124). Los ratones mutantes que son deficientes en *SIRT6* muestran un envejecimiento acelerado (12), mientras que los ratones transgénicos machos que sobreexpresan *SIRT6* tienen una vida útil más larga que los animales de control, lo que se asocia con IGF-1 sérico reducido y otros indicadores de la señalización de IGF-1 (124).

Por otro lado, *SIRT3* ubicada en las mitocondrias parece mediar en algunos de los efectos beneficiosos de la restricción dietética en la longevidad, aunque sus efectos no se deben a modificaciones de histonas sino, más bien, a la desacetilación de proteínas mitocondriales. Además, se ha detectado que la sobreexpresión de *SIRT3* mejora la capacidad regenerativa de las células madre hematopoyéticas envejecidas (109).

En cuanto a su relación con la actividad mitocondrial, SIRT1 modula la biogénesis mitocondrial a través de un proceso que involucra al coactivador transcripcional PGC-1 α y la eliminación de las mitocondrias dañadas por autofagia. SIRT3, que es la principal desacetilasa mitocondrial, se dirige a muchas enzimas involucradas en el metabolismo energético, incluidos los componentes de la cadena respiratoria, el ciclo del ácido tricarboxílico, la cetogénesis y la β -oxidación de ácidos grasos. SIRT3 también puede controlar directamente la tasa de producción de ERO mediante la desacetilación de la superóxido dismutasa de manganeso, una importante enzima antioxidante mitocondrial. En conjunto, estos datos respaldan la idea de que los telómeros y las sirtuinas pueden controlar la función mitocondrial y, por lo tanto, desempeñar un papel protector contra las enfermedades asociadas con la edad (109).

Con respecto a las evidencias disponibles acerca de que las sirtuinas pueden tener un impacto en las respuestas inflamatorias asociadas con el envejecimiento, varios estudios han revelado que, al desacetilar las histonas y los componentes de las vías de señalización inflamatorias como NF- κ B, SIRT1 puede regular a la baja los genes relacionados con la inflamación (125). De acuerdo con estos hallazgos, la reducción de los niveles de SIRT1 se correlaciona con el desarrollo y la progresión de muchas enfermedades inflamatorias, y la activación farmacológica de SIRT1 puede prevenir las respuestas inflamatorias en ratones (126, 127). SIRT6 también puede regular a la baja la respuesta inflamatoria a través de la desacetilación de las subunidades NF- κ B y la represión transcripcional de sus genes diana (128).

Por todo ello, en los mamíferos, al menos tres miembros de la familia de las sirtuinas (SIRT1, SIRT3 y SIRT6) contribuyen al envejecimiento saludable.

4. CONCLUSIÓN/RESUMEN DE LA INTRODUCCIÓN

En resumen, el envejecimiento está mediado por diferentes factores interconectados entre sí y que actúan a diferentes niveles. De entre ellos, tanto la longitud telomérica como la inflamación se pueden utilizar como marcadores para medir el grado de envejecimiento. Factores exógenos como la nutrición y específicamente el tipo de dieta, y exógenos como los genes influyen también en el grado de envejecimiento individual. La interacción entre los diversos factores resulta de gran interés.

III. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis pretende demostrar que el tipo de dieta podría interactuar con los factores genéticos individuales para modular el grado de envejecimiento individual medido como la evolución en el tiempo de la longitud de los telómeros y de parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo. La hipótesis nula sería que en nuestros pacientes no se observarían cambios en el grado de envejecimiento entre las diferentes variantes alélicas y tipos de dieta.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL:

Investigar si el consumo crónico, durante 4 años, de una alimentación Mediterránea, rica en aceite de oliva (38% de calorías en forma de grasa, con 22% MUFA), o una dieta pobre en grasa, (<28% de calorías en forma de grasa, 12% como MUFA) interacciona con determinados polimorfismos genéticos candidatos implicados en la senescencia biológica, para modificar la longitud relativa de los telómeros en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida.

OBJETIVO SECUNDARIO:

Estudiar las interacciones entre estos polimorfismos y la dieta en relación con otros factores (sexo, tabaco, alcohol) que también puede influir en el grado de senescencia sobre los mismos parámetros que los enumerados en el objetivo principal.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio CORDIOPREV es un ensayo clínico, prospectivo, aleatorizado, simple ciego y controlado, en prevención secundaria cardiovascular que incluye a 1.002 pacientes. El principal objetivo clínico de este estudio fue evaluar la eficacia de una dieta mediterránea rica en aceite de oliva en comparación con una dieta baja en grasas para prevenir la aparición de nuevos eventos cardiovasculares y mortalidad en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida. Los detalles del estudio se encuentran recogidos en la web [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00924937) (NCT00924937). Los participantes fueron aleatorizados a las dos dietas del estudio: Dieta Mediterránea y dieta baja en grasa. Para garantizar que la principal fuente de grasa de la Dieta Mediterránea fuera idéntica para todos los pacientes de este grupo, los investigadores del estudio proporcionaron a los participantes el aceite de oliva consumido durante el período de intervención (1 litro por semana por participante). De igual forma, los pacientes aleatorizados al grupo de dieta baja en grasa recibieron paquetes de alimentos que incluían alimentos bajos en grasa y ricos en hidratos de carbono complejos (cereales, galletas, pasta, etc.). El periodo de seguimiento de la intervención fue de siete años.

2. ALEATORIZACIÓN

Las variables utilizadas para la aleatorización fueron: 1) sexo (hombre/mujer); 2) edad (≤ 60 años/ > 61 años) y 3) historia de IAM previo (sí/no). Con las combinaciones posibles de estas 3 categorías se crearon 8 grupos aleatorizando a los pacientes a los 2 grupos de intervención. Dicho proceso se llevó a cabo por expertos en aleatorización en estudios de intervención pertenecientes a la Escuela Andaluza de Salud Pública. Una vez que el paciente cumplía criterios de inclusión en el estudio, utilizando un sistema de codificación, los dietistas se comunicaban por vía telefónica con el equipo de la Escuela Andaluza de Salud Pública, que aleatoriamente asignaba al paciente a uno u otro grupo con el fin de que durante todo el procedimiento se mantuviera el ciego simple.

3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los pacientes fueron reclutados desde noviembre de 2009 hasta febrero de 2012, principalmente en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España), aunque también se reclutaron algunos pacientes de otros hospitales de las provincias de Córdoba y Jaén. Los criterios de inclusión y exclusión han sido publicados previamente (129) y se encuentran detallados en la tabla 2.

Los pacientes, hombres y mujeres, entre 20 y 75 años de edad, que habían sufrido un evento coronario hacía más de seis meses de la fecha de inclusión en el estudio eran candidatos a participar en el estudio. Adicionalmente, no podían tener enfermedades graves o una esperanza de vida menor a la duración del estudio y debía estar dispuestos a seguir una intervención dietética a largo plazo. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio, previamente aprobado por el comité de ética local, siguiendo la declaración de Helsinki y las buenas prácticas clínicas.

Para la realización del subestudio presentado en este trabajo de tesis doctoral, se utilizó una población anidada en el estudio CORDIOPREV del proyecto FIS PI13/00185. Para ello se seleccionaron 716 pacientes que contaban con la determinación de la longitud de los telómeros en situación basal y al cabo de 4 años de seguimiento. En dichos pacientes se realizó la determinación de polimorfismos genéticos de los genes *PINX1*, *TERC*, *TERT*, *TOMM40*, *APOE*, *APOC1*, *FOXO1A*, *FOXO3A*, *SIRT1*, *ADIPOQ*, *COQ7*, *COQ8*, *COQ9*, en regiones candidatas a influir sobre el proceso de envejecimiento.

Edad para ser elegible	- 20 a 75 años
Género para ser elegible	- Ambos
Voluntarios sanos	- No
Criterios de Inclusión	<ul style="list-style-type: none"> - Patología coronaria inestable - Infarto agudo de miocardio - Angina inestable - Angina estable crónica con alto riesgo de evento cardiovascular
Criterios de Exclusión	<ul style="list-style-type: none"> - Edad <20 o >75 años (o esperanza de vida inferior a 5 años). - Pacientes con una revascularización programada con < 6 meses antes de su inclusión en el ensayo. - Insuficiencia cardíaca grado II-IV (New York Heart Association). - Disfunción ventricular izquierda con FEVI < 35 %. - Incapacidad o impedimento para seguir el protocolo. - Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 severa o no controlada, o aquellos con insuficiencia renal con creatinina plasmática > 2 mg/dl. - Otras patologías crónicas: enfermedades psiquiátricas, insuficiencia renal crónica, hepatopatía crónica, neoplasia activa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedades digestivas.

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión del estudio CORDIOPREV (129).

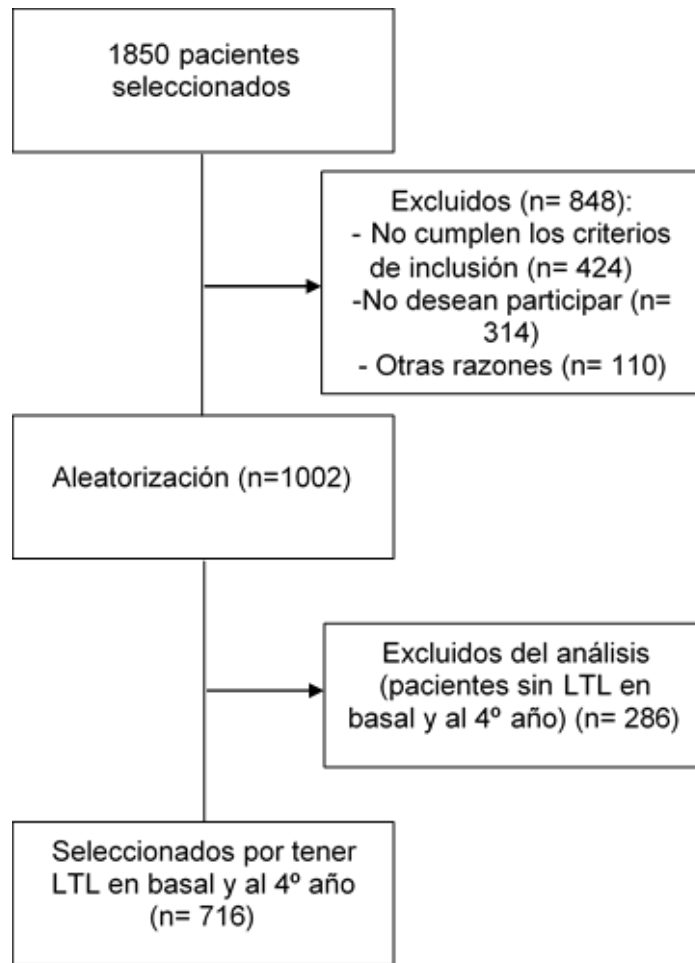


Figura 2. Diagrama de flujo de los pacientes del estudio CORDIOPREV seleccionados

4. INTERVENCIÓN DIETÉTICA

Los pacientes fueron aleatorizados a seguir dos patrones de alimentación saludables: una dieta mediterránea rica en aceite de oliva virgen, con al menos un 35% de las calorías provenientes de la grasa (22% ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), 6% PUFA, menos del 10% ácidos grasos saturados (SFA)), 15% proteínas y un máximo de 50% hidratos de carbono; y una dieta baja en grasas y alta en hidratos de carbono complejos, con menos del 30 % de grasas totales (12–14 % de MUFA, 6–8 % de PUFA y menos del 10 % de SFA), 15 % de proteínas y un mínimo de 55 % de hidratos de carbono.

Los dos patrones dietéticos del estudio CORDIOPREV incluyen alimentos de los grandes grupos alimenticios sin una restricción específica sobre el consumo calórico. La principal diferencia entre los dos grupos de intervención radica en la ingesta de grasa total, su procedencia, así como en su composición cualitativa. En la tabla 3 se resumen las recomendaciones para cada tipo de dieta.

Se realizaron sesiones informativas para cada tipo de dieta y se realizó un seguimiento periódico por nutricionistas, tal y como se detalla a continuación. La adherencia a la dieta en el estudio CORDIOPREV ha sido publicada previamente por Quintana-Navarro et al(130).

	Dieta Mediterránea	Dieta Baja en Grasas
Aceite (incluido el aceite usado para cocinar, aderezar y en comidas consumidas fuera de casa)	Cuatro o más cucharadas de aceite de oliva virgen extra al día (40–60 g al día)	Menos de dos cucharadas de aceites vegetales (girasol, oliva convencional) al día (20–30 g al día)
Fruta	Tres o más raciones de fruta fresca y zumos naturales al día	Tres o más raciones de fruta fresca, congelada, enlatada o desecada al día
Verdura	Al menos dos raciones al día, una de ellas cruda o como ensalada	Al menos dos raciones al día (fresca, congelada o enlatada, sin grasa, salsa o sal añadida)
Cereales y patatas	Seis raciones de cereales preferiblemente enteros	Seis a once raciones de cereales (preferiblemente integrales), patatas y legumbres al día
Legumbres	Al menos tres veces a la semana	Seis a once raciones de cereales (preferiblemente integrales), patatas y legumbres al día
Lácteos	Dos raciones al día	Dos o tres raciones de lácteos bajos en grasa o sin grasa al día
Nueces	Al menos tres raciones de nueces crudas a la semana	Consumo ocasional, menos de una ración a la semana
Pescado y marisco	Al menos tres raciones de pescados grasos a la semana	Evitar pescados grasos y mariscos enlatados en aceite a una ración por semana o menos
Carne blanca	Consumir preferiblemente carnes blancas (pollo, pavo o conejo) en lugar de rojas, retirar la piel y grasa visible	Elegir carne de ave sin piel y otros cortes magros (como el lomo o redondo)
Carne roja y procesada	Menos de una ración semanal	Una ración o menos a la semana
Huevos	Entre dos y cuatro unidades a la semana	Dos o menos yemas de huevo a la semana
Bollería comercial, dulces y pasteles	Una ración o menos a la semana	Una ración o menos a la semana
Mantequilla y margarina	No permitida	Una vez o menos a la semana
Vino	Consumo opcional, solo en caso de consumidores previos (un vaso al día en mujeres y dos al día en hombres)	No permitido

Bebidas azucaradas o carbonatadas	Menos de una vez al día	Menos de una vez al día
Técnicas culinarias	Uso de sofrito (salsa casera con ajo, cebolla, hierbas aromáticas y tomate cocido a fuego lento en aceite de oliva) dos o más veces a la semana	Usar métodos de cocinado bajo en grasa (como asar, hornear, microondas), evitar fritura y uso de sofrito, eliminar la grasa visible antes de cocinar

Tabla 3. Recomendaciones dietéticas por grupos de pacientes

5. VISITAS Y SEGUIMIENTO

La intervención dietética realizada en el estudio CORDIOPREV ha sido llevada a cabo por un grupo de dietistas especializadas. Estas dietistas dieron las directrices a seguir en cada grupo de intervención, revisaron los cuestionarios de adherencia a la dieta, y elaboraron el material escrito y gráfico proporcionado a los participantes. Además, participaron en la programación e impartición de las sesiones grupales que periódicamente se realizaron a lo largo de la intervención.

Los detalles de las evaluaciones dietéticas y las visitas de seguimiento se recogen en publicaciones previas de nuestro grupo (129). Durante el primer año de intervención se diseñaron varias sesiones grupales con el fin de facilitar un mejor seguimiento por parte de los pacientes, discutir problemas encontrados y proporcionar soluciones a los mismos. El objetivo principal de la intervención fue adaptar los hábitos dietéticos de cada individuo al patrón dietético, por encima de nutrientes concretos.

La valoración basal de los participantes se llevó a cabo en 2 visitas consecutivas. En cada una de las visitas el paciente se entrevistó personalmente con la dietista durante una hora aproximadamente. Durante la primera visita, tras la firma de los consentimientos informados, se realizó una valoración por el especialista en Medicina Interna encargado de realizar la valoración física y un cuestionario clínico al paciente. Las medidas antropométricas (peso, estatura, IMC y perímetro de cintura) fueron realizadas en la primera visita por dietistas entrenadas de una forma estandarizada. La medición del perímetro de cintura se llevó a cabo a una distancia media entre la última costilla y la cresta iliaca utilizando una cinta métrica. El cálculo del IMC se llevó a cabo con la fórmula: kg/m^2 . Además, a los participantes se les realizó extracción de analítica. La valoración nutricional de la primera visita incluía una explicación detallada sobre la intervención dietética junto con la realización de los siguientes cuestionarios:

- Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ) compuesto por 137 ítems con el fin de poder determinar la ingesta dietética general del año previo a la inclusión del paciente.
- Cuestionario para valorar la adherencia a la dieta.
- Versión española del “*Minnesota physical activity questionnaire*” para valorar la actividad física de los pacientes.
- Cuestionario SF36 para valorar la calidad de vida de los pacientes.

En la segunda visita, tras la aleatorización, las dietistas revisaron los cuestionarios realizados previamente y proporcionaron recomendaciones dietéticas específicas del grupo de intervención asignado a cada participante, adecuando la información a las condiciones clínicas de los pacientes (diabetes mellitus tipo 2, dislipemia, obesidad, etc.) y proporcionando estrategias para ayudar a éstos a modificar sus hábitos dietéticos con el objetivo de mantenerlos a largo plazo. Todos los participantes recibieron un folleto informativo con recomendaciones dietéticas y recursos para adecuar la frecuencia de consumo, porciones y tamaño de las raciones.

El seguimiento posterior incluía visitas presenciales con periodicidad semestral, visitas grupales trimestrales y llamadas telefónicas bimensuales para favorecer el contacto frecuente entre los pacientes y los dietistas. En total, anualmente se realizaban un total de 12 contactos presenciales y telefónicos con cada paciente.

6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS Y BIOQUÍMICAS

Al inicio del estudio se recolectaron muestras de sangre de los participantes tras 12 horas de ayuno nocturno. Una vez al año durante el período de seguimiento de la intervención, en las mismas condiciones se extrajeron muestras sanguíneas. En el presente trabajo utilizamos los parámetros bioquímicos obtenidos al inicio del estudio y a los 4 años de seguimiento. Las muestras de plasma y suero se recolectaron en tubos individuales y se centrifugaron, luego se congelaron inmediatamente a -80°C . Las medidas bioquímicas fueron realizadas en el Hospital Universitario Reina Sofía por personal externo al estudio que desconocía la calidad de las intervenciones. Las principales variables bioquímicas utilizadas en el presente estudio fueron triglicéridos, colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL), glucosa y PCRus. Las metodologías utilizadas para llevar a cabo las mediciones han sido descritas previamente (131): Se tomaron muestras de sangre venosa de la vena antecubital y se recogieron en tubos Vacutainer sin anticoagulante y en tubos que contenían EDTA, y se transfirieron inmediatamente a 4°C . Se añadió un cóctel inhibidor de proteasa (Roche Diagnostic, Alemania) al plasma ($40\ \mu\text{L} / \text{mL}$) para minimizar la degradación proteolítica. Las muestras de plasma y suero se congelaron a -80°C para un posterior análisis bioquímico. Los parámetros séricos se midieron en los analizadores Architect c-16000 (Abbott®, Chicago, Illinois, EE. UU) mediante técnicas espectrofotométricas (métodos colorimétricos enzimáticos): método de hexoquinasa para glucosa y oxidación-

peroxidación para colesterol total, C-HDL y triglicéridos (TG). El C-LDL se calculó utilizando la fórmula de Friedewald (siempre que el nivel de triglicéridos fuera inferior a 400 mg/dl). Los niveles de PCRus se determinaron con una técnica ultrasensible por inmunoturbodimetría y se midió en el analizador Architect c-16000 (Abbott®, Chicago, Illinois, EE. UU.).

7. PARÁMETROS RELACIONADOS CON ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN

Los datos relacionados con el estrés oxidativo y la inflamación se recogieron en el seno del proyecto de investigación PI13-00185 del Instituto de Salud Carlos III [28]. Se determinaron los productos de peroxidación lipídica (LPO), el glutatión total, glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) y la relación GSH/GSSG. Se midió el contenido de glutatión reducido y glutatión oxidado en las muestras de plasma utilizando el kit BIOXYTECH® GSH-400 (OXIS International Inc., Portland, OR, EE. UU.) y el kit GSH-412 (OXIS International Inc., Portland, OR, EE. UU.) respectivamente. El TNF- α se midió utilizando kits ELISA de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas disponibles comercialmente (R & D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.).

8. AISLAMIENTO DEL ADN DE MUESTRAS DE SANGRE

El ADN se obtuvo de las células sanguíneas de la fracción de la capa leucocitaria de la sangre contenida en tubos con EDTA. El ADN se aisló mediante el método de salting-out y luego se resuspendió en 500 μ L de tampón 1 x TE (132).

9. GENOTIPADO

Se realizó el genotipado de los genes relacionados con el envejecimiento incluyendo: *PINX1*, *TERC*, *TERT*, *TOMM40*, *APOE*, *APOC1*, *FOXO1A*, *FOXO3A*, *SIRT1*, *ADIPOQ*, *COQ7*, *COQ8*, *COQ9*), de genes relacionados con inflamación (interleukinas, *PCRus*, *PPAR-gamma*, *TNF*), obesidad (*FTO*, *MCAR4R*, *GHRLOS*), metabolismo lipídico (*LPL*, *APOA*, *APOB*, *APOC1*, *ABCA1*, *ADIPOQ*), y diabetes (*CAPN10*, *IGF2BP2*, *igf1r*, *TCF7L2*, *CAPN3*, *TCF7L2*), con la plataforma OpenArray™ proporcionada por Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

Específicamente, para los principales polimorfismos de este estudio, se utilizaron los ensayos TaqMan C__1340389_10 (nombre del ensayo: hCV1340389) para rs7069102 y C__11642237_10 (nombre del ensayo: hCV11642237) para rs1885472 proporcionados por Thermo Fisher Scientific Inc. (Base de datos: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/snp-genotyping-taqman-assays.html>). El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando un robot AccuFill™ para cargar matrices, un termociclador 9700 para PCR y un termociclador NT para lectura de fluorescencia (todos proporcionados por Thermo Fisher Scientific Inc.).

El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se midió utilizando la herramienta bioinformática Gene-calc (Disponible online: www.gene-calc.pl). Se usó el software TaqMan™ Genotyper V 1.3 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) para denominar al genotipo. Utilizamos 1000 GENOMAS fase_3: SII (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index), como población de referencia. El nivel de LD por pares entre los SNP de *SIRT1* se validó mediante el análisis de los valores de D' y r^2 utilizando Ensembl (Human GRCh38.p13) en el mismo grupo de población.

10. PCR CUANTITATIVA Y ANÁLISIS DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS

Analizamos la longitud de los telómeros leucocitarios (LTL) al inicio y tras cuatro años de seguimiento, según el protocolo del estudio. Utilizamos el método de Cawthon con qPCR (83), siguiendo la metodología y experiencia previa de nuestro grupo. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador iQ5 usando un kit SensiFAST™ SYBR Lo-ROX, donde para todas las muestras se estimó la proporción de telómero a gen constitutivo RPL13a. La secuencia de los cebadores utilizados y las condiciones de la qPCR se han publicado previamente (131).

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS Statistics para Windows (versión 28.0) (IBM. Chicago, IL, EE. UU.). Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias en los parámetros

bioquímicos y antropométricos medios y la interacción con el genotipo se evaluaron mediante análisis ANOVA de un factor. La comparación de parámetros clínicos y antropométricos según dieta y genotipo se realizó mediante análisis ANOVA de un factor, de forma separada e independiente para cada dieta, con el genotipo SNP rs7069102 como factor. Las comparaciones de frecuencias entre variables cualitativas se realizaron mediante la prueba Chi-Cuadrado. Se utilizó ANOVA para medidas repetidas para analizar los cambios durante el estudio. Se utilizó el estadístico de contraste Greenhouse-Geisser cuando no se cumplió el supuesto de esfericidad. En este análisis, estudiamos la influencia general del genotipo (ANOVA global, *P* para la influencia del genotipo), la cinética de la intervención (*P* para el tiempo) y la interacción de los dos factores (genotipo versus tiempo). Cuando los análisis de prueba post hoc fueron pertinentes, utilizamos pruebas de comparación múltiple con la corrección de Sidak. *P* < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

12. MÉTODOS DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para realizar la revisión bibliográfica se utilizó la web (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) conocida como PUBMED y el motor de búsqueda MEDLINE ofrecido por la Biblioteca Nacional de los Estados Unidos, utilizándose varias entradas, palabras clave o encabezamientos MeDH del Index Medicus. Se empleó a su vez el proveedor de información Ovid Technologies al que se accede a través del Ovid Web Gateway y la biblioteca virtual Scielo formada por una colección de revistas científicas españolas de ciencias de la salud seleccionadas de acuerdo a unos criterios de calidad preestablecidos.

Todas estas plataformas utilizadas junto con la consulta directa de determinadas revistas científicas se realizaron a través de la Biblioteca Virtual del Servicio de Salud Público de Andalucía (SSPA) (<http://www.bvsspa.es/profesionales/>).

Las referencias aparecen presentadas con el estilo o normas de Vancouver para la publicación de manuscritos en el ámbito de las Ciencias de la Salud.

VI. RESULTADOS

Se ha analizado la influencia de diferentes polimorfismos localizados en genes candidatos relacionados con el proceso de envejecimiento, como son *PINX1*, *TERC*, *TERT*, *TOMM40*, *APOE*, *APOC1*, *FOXO1A*, *FOXO3A*, *SIRT1*, *ADIPOQ*, *COQ7*, *COQ8*, *COQ9*. A continuación, se muestran los resultados más relevantes obtenidos relativos a los polimorfismos localizados en el gen *SIRT1* (112).

1. CARACTERÍSTICAS BASALES SEGÚN GENOTIPO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN *SIRT1*

Las distribuciones de genotipos de los SNP rs7069102 y rs1885472 no se desviaron de las expectativas de Hardy-Weinberg. Se compararon las frecuencias alélicas observadas para ambos SNP con la base de datos de 1000 genomas. La frecuencia del alelo menor para el SNP rs7069102 fue C = 0,305 (1000 genomas: C = 0,355) y para el SNP rs1885472 fue G = 0,317 (1000 genomas: G = 0,355). Las frecuencias genotípicas observadas para el SNP rs7069102 fueron G/G = 47,8%; G/C = 43,4%; C/C = 8,8 %, y para el SNP rs1885472 fueron C/C = 47 %; C/G = 42,5%; G/G = 10,5%. El análisis de LD mostró que los SNP rs1885472 y rs7069102 eran $D' = 1,000$ y $r^2 = 1,000$, lo que sugiere que los loci están en LD completo y son coheredados en la mayoría de los casos. Por tanto, dada su asociación, y la existencia de literatura previa con el SNP rs7069102, pero no con el rs1885472, se muestra el análisis con el rs7069102 en este trabajo. Dado que los análisis no indican un comportamiento recesivo para este SNP y dadas las bajas frecuencias del genotipo CC en rs7069102, se realizan los análisis posteriores utilizando un modelo dominante para el alelo menor.

Las características demográficas, antropométricas y bioquímicas atendiendo al SNP rs7069102 se muestran en la tabla 4. No se observaron diferencias significativas según el genotipo para los valores basales de parámetros antropométricos, colesterol, glucosa o PCR para SNP rs7069102.

Dichas características según el SNP rs7069102 y la dieta se presentan en la tabla 5. Al inicio del estudio, se objetivó una diferencia significativa en el peso de los pacientes aleatorizados a la dieta mediterránea que también eran portadores del alelo C en comparación con portadores del genotipo GG ($P = 0,043$). No se observaron diferencias

significativas en el resto de los parámetros analizados, ni en los pacientes aleatorizados al patrón de dieta baja en grasas.

	rs7069102		
	GG	CG+CC	p
n	451	493	
Hombre/mujer (n)	379/72	398/95	0.184
Edad (años)	59.3 ± 9	59.9 ± 9.1	0.380
Peso (kg)	86.2 ± 14.5	84.5 ± 14.7	0.067
Perímetro de cintura (cm)	105.3 ± 11.5	104.9 ± 11.1	0.587
IMC (kg/m ²)	31.4 ± 4.6	30.9 ± 4.3	0.107
Colesterol total (mg/dL)	157.4 ± 31.1	160.4 ± 30.6	0.134
C-HDL (mg/dL)	41.9 ± 9.7	42.3 ± 10.4	0.508
C-LDL (mg/dL)	87.5 ± 25.1	90.2 ± 25.7	0.116
TG (mg/dL)	133.8 ± 69.5	136 ± 68.5	0.631
Glucosa (mg/dL)	114.7 ± 39.6	112.9 ± 38.0	0.471
PCRus (mg/dL)	3.2 ± 3.9	3 ± 3.4	0.470

Tabla 4. Características de los pacientes incluidos en el estudio atendiendo al SNP rs7069102 del gen *SIRT1*. Valores expresados como media ± SEM. IMC, índice de masa corporal; C-HDL, colesterol vehiculado en las lipoproteínas de alta densidad; C-LDL, colesterol vehiculado en las lipoproteínas de baja densidad; TG, triglicéridos; PCRus, proteína C reactiva ultrasensible. Variables calculadas utilizando ANOVA de un factor. En negrita valores p < 0.05

	Dieta baja en grasa			Dieta Mediterránea		
	GG	CG+CC	p	GG	CG+CC	p
n	162	171		189	194	
Hombre/Mujer (n)	134/28	145/26	0.607	164/25	151/43	0.022
Edad (años)	58.7 ± 8.7	59.6 ± 8.1	0.329	59.3 ± 8.9	59.8 ± 9.2	0.629
Peso (kg)	85.3 ± 12.8	84.5 ± 12.2	0.547	86.6 ± 14.2	83.7 ± 14	0.043
Perímetro de cintura (cm)	104.5 ± 10.4	105.1 ± 10.2	0.628	105.2 ± 11.5	104.1 ± 11	0.311
IMC (kg/m ²)	31.2 ± 4.3	30.7 ± 4	0.289	31.4 ± 4.4	30.9 ± 4.4	0.315
Colesterol total (mg/dL)	157 ± 29.8	160 ± 28	0.359	158 ± 33	159 ± 31	0.723
C-HDL (mg/dL)	42 ± 10	42 ± 10.1	0.452	42 ± 10	42 ± 10	0.931
C-LDL (mg/dL)	87 ± 23.9	90 ± 23.5	0.281	88 ± 27	90 ± 25	0.486
TG (mg/dL)	128 ± 64	142 ± 73	0.063	137 ± 71	130 ± 64	0.315
Glucosa (mg/dL)	108 ± 29	113 ± 38	0.219	115 ± 41	111 ± 36	0.316
PCRus (mg/dL)	3.6 ± 4.3	2.8 ± 3.2	0.073	2.7 ± 3.7	2.8 ± 3.1	0.945

Tabla 5. Características de los pacientes según el genotipo para el polimorfismo rs7069102 del gen *SIRT1* y la dieta. Los valores se expresan como media ± SEM. IMC, índice de masa corporal; C-HDL, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; C-LDL, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; TG, triglicéridos; PCRus, proteína C reactiva. En negrita los valores de $p < 0.05$.

2. RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO rs7069102 Y LA LONGITUD DE TELÓMEROS DURANTE LA INTERVENCIÓN

En la población estudiada, observamos un mantenimiento de la LTL en pacientes portadores del genotipo mayoritario GG, en contraste con los portadores del alelo minoritario C, donde la LTL disminuyó después de 4 años de seguimiento en comparación con la basal ($P = 0,001$) (Figura 3).

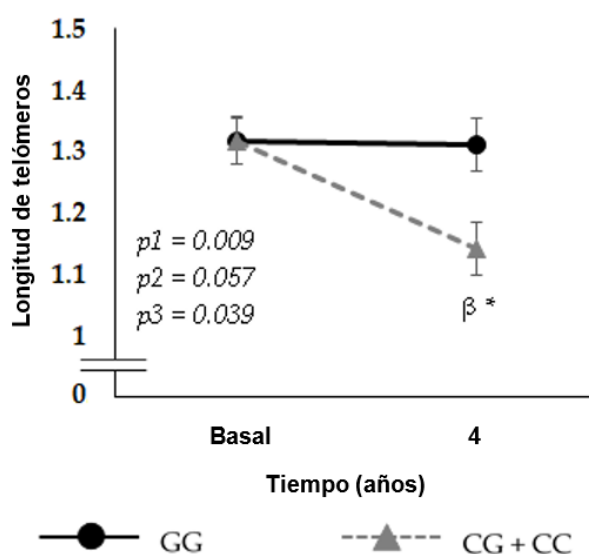
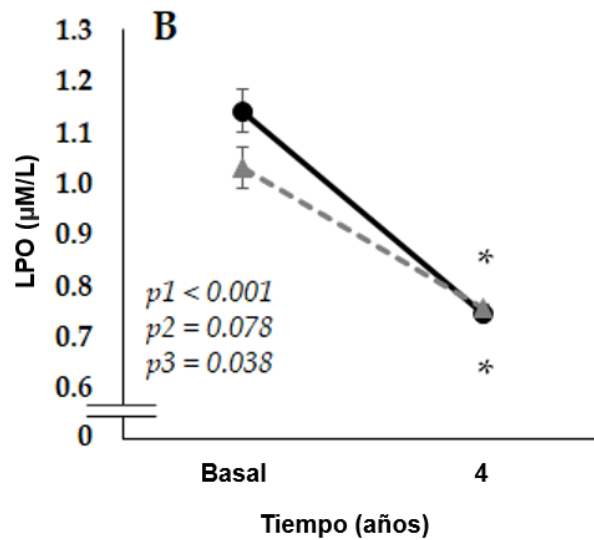
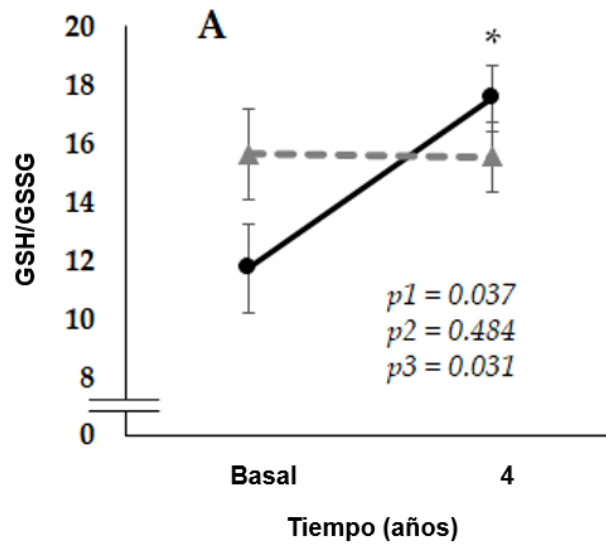


Figura 3. Longitud de telómeros según el genotipo para el polimorfismo rs7069102 del gen *SIRT1* durante el periodo de seguimiento. Los datos se expresan como media \pm SEM analizados mediante ANOVA de medidas repetidas; donde p_1 : influencia de la dieta, p_2 : tiempo de seguimiento y p_3 : interacción entre ambos factores (dieta y tiempo). En el análisis post-hoc se realizaron comparaciones múltiples con corrección de Sidak * $p < 0.05$ 4 año vs basal, β $p < 0.05$ genotipos en el mismo tiempo. Datos relativos al grupo completo. Número de pacientes GG 351, CG+CC 365

3. RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO rs7069102 Y LOS PARÁMETROS RELACIONADOS CON ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN

Los individuos con el genotipo GG mostraron un aumento en los valores de la relación GSH/GSSG en comparación con sus niveles basales ($P = 0,003$) (Figura 4A). Los

niveles de LPO disminuyeron en ambos genotipos (GG y CG+CC) (ambos $P < 0,001$), siendo el descenso mayor en los portadores del genotipo GG (Figura 4B). Además, se observó una disminución significativa de los niveles de TNF- α tanto en el genotipo GG como en el CG+CC (ambos $P < 0,001$, respectivamente), siendo dicha reducción mayor en los homocigotos GG tras los 4 años de seguimiento ($P = 0.022$) (Figura 4C).



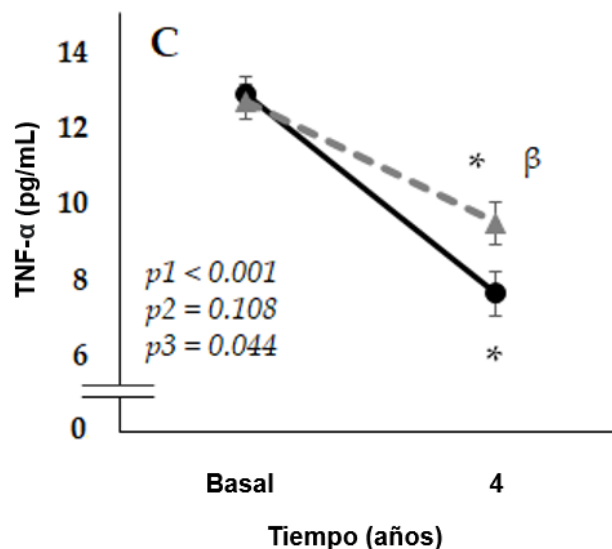


Figura 4. Cambios en las variables asociadas con el estrés oxidativo y la inflamación según el genotipo para el polimorfismo rs7069102 del gen *SIRT1*. Los datos se expresan como media \pm SEM analizados mediante ANOVA de medidas repetidas; donde p1: tiempo de seguimiento, p2: influencia del genotipo y p3: interacción entre ambos factores (tiempo y genotipo). En las pruebas post-hoc utilizamos comparaciones múltiples con corrección de Sidak. * $p < 0.05$ 4 años vs. basal, β $p < 0.05$ genotipos en el mismo tiempo. Datos relativos al grupo completo. Número de pacientes GG 351, CG+CC 365

4. EFECTO DE LA DIETA SOBRE LA LONGITUD DE TELÓMEROS, Y SOBRE LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO ATENDIENDO A LAS VARIANTES GENÉTICAS DEL GEN *SIRT1*

4.1. PACIENTES ALEATORIZADOS A DIETA BAJA EN GRASA

Para el SNP rs7069102, tras la intervención dietética con la dieta baja en grasas, se observó una estabilización en la longitud de los telómeros de los leucocitos en los sujetos con el genotipo GG, que disminuyó significativamente en los sujetos portadores de los genotipos CG+CC ($p = 0,012$) (Figura 5A). Los niveles de TNF- α disminuyeron después de 4 años en sujetos portadores de ambos genotipos (GG $P < 0,001$ y CG+CC $P = 0,020$). Sin embargo, esta disminución fue significativamente mayor en los sujetos portadores del genotipo GG ($p = 0,007$) (Figura 5B). Además, los portadores GG también mostraron una disminución significativa en los niveles de PCRus en comparación con los portadores del alelo C (interacción tiempo frente al genotipo $P = 0,025$) (Figura 5C).

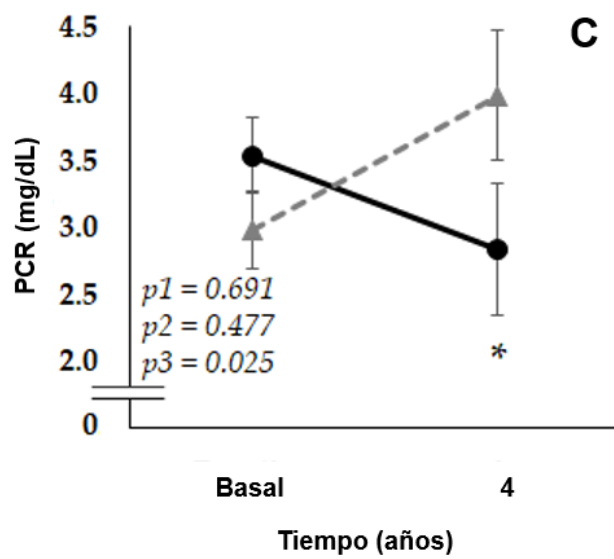
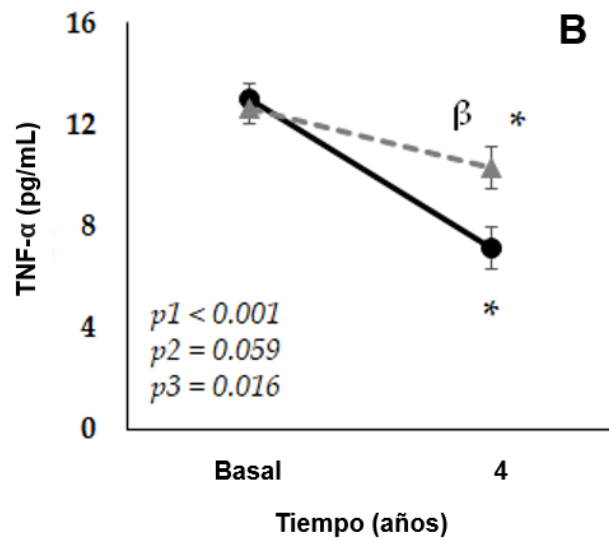
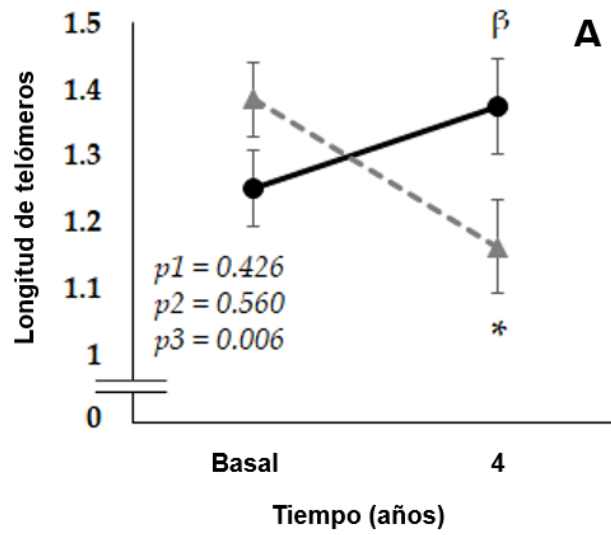
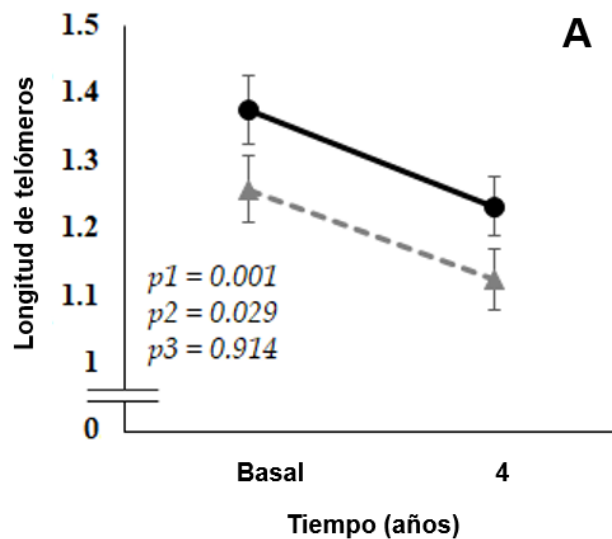


Figura 5. Interacción entre la dieta y los parámetros relacionados con el envejecimiento y la inflamación según el genotipo para el polimorfismo rs 7069102 del gen SIRT1. Los datos se expresan como media \pm SEM analizados mediante ANOVA de medidas repetidas; donde p1: tiempo de seguimiento, p2: influencia del genotipo y p3: interacción entre ambos factores (tiempo y genotipo). En las pruebas post-oc utilizamos comparaciones múltiples con corrección de Sidak. * $p < 0.05$ 4 años vs. basal, $\beta p < 0.05$ genotipos en el mismo tiempo. Datos relativos al grupo completo. Número de pacientes GG 351, CG+CC 365

4.2. PACIENTES ALEATORIZADOS A DIETA MEDITERRÁNEA

La longitud de los telómeros disminuyó en los pacientes GG y GC+CC después de 4 años de intervención con este modelo de dieta. No se observaron diferencias significativas entre los pacientes GG y GC+CC en términos de niveles plasmáticos de TNF- α y niveles de PCRus (Figura 6 A, B, C).



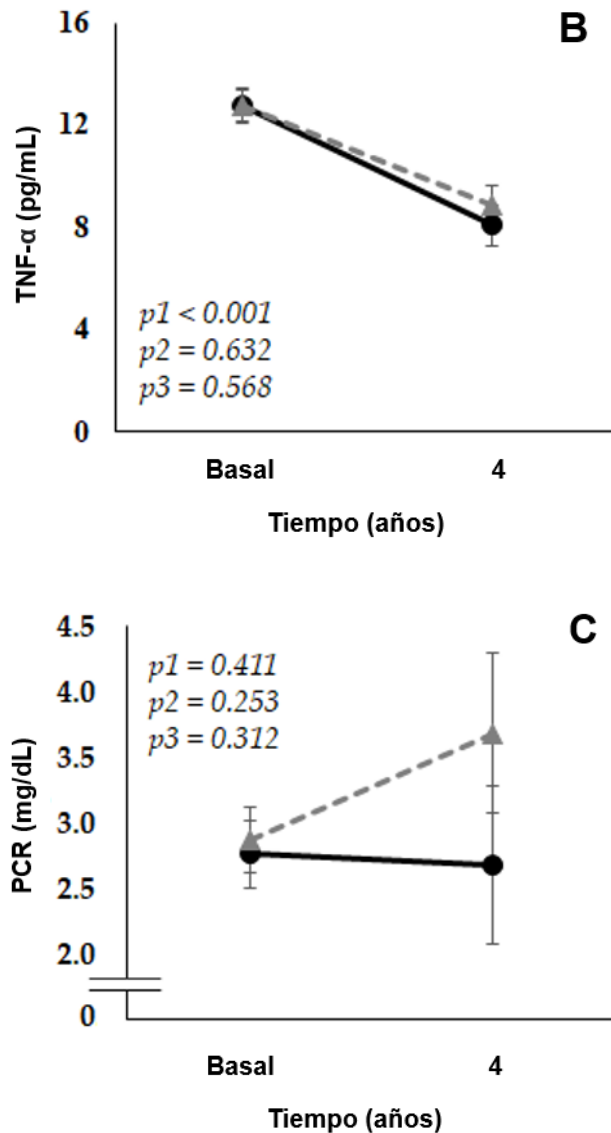


Figura 6. Interacción entre la dieta y los parámetros relacionados con el envejecimiento y la inflamación según el genotipo para el polimorfismo rs7069102 del gen *SIRT1*. Los datos se expresan como media \pm SEM analizados mediante ANOVA de medidas repetidas; donde *p1*: tiempo de seguimiento, *p2*: influencia del genotipo y *p3*: interacción entre ambos factores (tiempo y genotipo). En las pruebas post-oc utilizamos comparaciones múltiples con corrección de Sidak. * $p < 0.05$ 4 años vs. basal, $\beta p < 0.05$ genotipos en el mismo tiempo. Datos relativos al grupo completo. Número de pacientes GG 351, CG+CC 365

5. INTERACCIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO rs7069102, LA DIETA Y LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS

Con respecto al análisis de los objetivos secundarios propuestos, no hemos encontrado interacciones significativas entre los factores sexo, consumo de tabaco y consumo de alcohol y la evolución de la longitud de los telómeros en nuestro grupo de pacientes.

6. RESULTADOS DE OTROS POLIMORFISMOS

En relación con el resto de polimorfismos localizados en los genes relacionados con el envejecimiento (rs11776767, rs12696304, rs16847897, rs3772190, rs113487931, rs10054203, rs2736122, rs2853669, rs2736098, rs33954691, rs2853691, rs157588, rs157590, rs157580, rs111833428, rs1064725, rs12691088, rs12721054, rs389261, rs5114, rs2755209, rs2721069, rs2755213, rs2764264, rs13217795, rs2802292, rs10823112, rs1063539, rs182052, rs8051232, rs1074359, rs7192898), se ha analizado su posible relación con la longitud de los telómeros sin hallar ninguna asociación relevante.

Además, se ha analizado la relación entre la longitud de telómeros y genes relacionados con inflamación (interleukinas, *PCRs*, *PPAR-gamma*, *TNF*), obesidad (*FTO*, *MCAR4R*, *GHRLOS*), metabolismo lipídico (*LPL*, *APOA*, *APOB*, *APOC1*, *ABCA1*, *ADIPOQ...*), y diabetes (*CAPN10*, *IGF2BP2*, *igf1r*, *TCF7L2*, *CAPN3*, *TCF7L2...*), sin observar tampoco ninguna asociación significativa.

Adicionalmente, se han realizado análisis en los que se distribuyó a los pacientes en tertiles en función de la longitud de los telómeros y analizamos la distribución de las variantes alélicas en cada SNP comparando aquellos pacientes con telómeros en el tercil inferior y superior, y ajustando por diferentes factores de confusión (edad, sexo, índice de masa corporal). Así, se identificó que los portadores del alelo minoritario del SNP rs3772190 del gen *TERC* y los homocigotos para el alelo minoritario de dos SNP del gen *FOXO3A* (rs2764264 y rs13217795) se asociaron a una menor longitud de los telómeros comparados con los pacientes portadores del genotipo mayoritario. El gen *TERC* codifica un componente ARN de la telomerasa, enzima que contribuye a evitar la senescencia celular, mientras que el gen *FOXO3A* regula las proteínas FOX, factores de transcripción que intervienen en la regulación de la apoptosis. No se objetivaron asociaciones en las otras 29 variantes genéticas evaluadas.

Por otra parte, se ha realizado un análisis en diferentes subgrupos de pacientes. Así en las personas con diabetes se objetivó que, tras 4 años de intervención, existe una interacción del polimorfismo rs2755213 del gen *FOXO* con la ingesta baja en grasas

(n=372). En concreto, los portadores del alelo C que reciben una dieta baja en grasa presentaron un menor acortamiento de los telómeros comparado con los homocigotos para el alelo T ($p=0,04$), concluyendo por tanto que en pacientes con diabetes y enfermedad cardiovascular establecida y dicha variable genética, el consumo de una dieta baja en grasa modula favorablemente el envejecimiento celular (medido como un menor acortamiento de telómeros), lo que puede contribuir a personalizar la dieta en este subgrupo de pacientes.

VII. DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran la interacción entre la dieta y la variante rs7069102 del gen *SIRT1* y su influencia sobre marcadores asociados al envejecimiento. Específicamente observamos que los sujetos homocigotos para el alelo mayoritario G que siguieron un patrón dietético bajo en grasas durante 4 años mostraron un patrón beneficioso con un menor acortamiento de la longitud de los telómeros, marcador del envejecimiento celular, comparado con los portadores del alelo minoritario C. Además, en estos pacientes también se observó una disminución de las concentraciones de TNF- α y PCRus, marcadores de estrés oxidativo e inflamación y que previamente se han asociado con un acortamiento de la longitud telomérica. Paralelamente, y para dar fortaleza a nuestros resultados, se realizó el mismo análisis con el polimorfismo rs1885472, con alto desequilibrio de ligamiento, replicando dichos resultados.

Se ha propuesto que el miedo a la muerte es una característica definitoria de los seres humanos (133). De ahí la importancia del aumento en 30 años de la esperanza de vida logrado durante el siglo XX, que además continúa incrementándose.

Datos recientes apuntan a que los adultos mayores viven ahora en estado de enfermedad y discapacidad durante más tiempo. En los años 60 del siglo XX, la duración media de la discapacidad al final de la vida era de 5,3 años frente a los 8,9 y 10,2 años en 1990 y 2017 respectivamente (134). Aunque no existe una definición única de envejecimiento saludable (135, 136), se entiende como la ausencia de enfermedades o deficiencias típicamente asociadas con la vejez definidas como aquellas condiciones en las que existe una relación cuadrática entre la prevalencia de la enfermedad y la edad cronológica (137) y que son: la sarcopenia, emaciación y osteoporosis, la fragilidad y las caídas, el deterioro cognitivo, las pérdidas de visión en forma de degeneración macular asociada a la edad, cataratas y retinopatía diabética, la pérdida de audición, las enfermedades no transmisibles como la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, la mala calidad del sueño, la apnea obstructiva del sueño, la incontinencia urinaria y el estreñimiento crónico. Este tipo de problemas pueden llegar a afectar hasta al 50% de la población mayor de 85 años (138).

La acumulación de células senescentes es característica del envejecimiento y se produce por la acción de agentes tanto internos como provenientes del exterior de la célula que conduce a la pérdida de su capacidad proliferativa de manera irreversible (139). Por una parte, la acumulación excesiva de células senescentes dificulta la regeneración de los tejidos. Además, las células senescentes secretan factores

inflamatorios que constituyen el denominado fenotipo secretor asociado a la senescencia que tiene efectos nocivos sobre el ambiente circundante (2). En este sentido, en nuestro estudio observamos que los pacientes sometidos a una dieta baja en grasa y que son homocigotos para el alelo mayoritario G muestran un mejor perfil de parámetros inflamatorios y relacionados con el estrés oxidativo, que se expresa en una disminución de las concentraciones de TNF- α y PCRus, lo que podría reflejar un mejor perfil de este fenotipo secretor asociado a la senescencia celular en relación con un proceso de envejecimiento más saludable.

Es importante establecer la diferencia entre "envejecimiento" y "senescencia celular", conceptos que, aunque en ocasiones se utilizan de manera indistinta, tienen diferentes significados, implicaciones e interconexiones. El envejecimiento conduce a la disminución progresiva del rendimiento funcional de los sujetos, aunque existe controversia sobre la relación existente entre el envejecimiento y la enfermedad y sobre la consideración del envejecimiento como enfermedad (140) ya que implica una mayor probabilidad de morir y/o una disminución de la funcionalidad con el tiempo (141).

Los primeros estudios sobre el proceso de la senescencia celular se realizaron en células diploides humanas replicativas cultivadas in vitro (142). Teniendo en cuenta que la mayoría de las células de los mamíferos no proliferan, el impacto causal de la senescencia replicativa en el envejecimiento sigue siendo controvertido. En este sentido se sugiere un mecanismo similar a la senescencia independiente de la proliferación en células postmitóticas, involucrado en el proceso de envejecimiento del individuo (143, 144) y que contribuye a reforzar las teorías de la interdependencia funcional entre el envejecimiento y la senescencia, aún controvertidas (145).

Entre los agentes exógenos que contribuyen la senescencia, más específicamente dentro del estilo de vida y además de la dieta (cuyo papel analizaremos en detalle más adelante), uno de los factores con un papel beneficioso sobre el envejecimiento saludable es el ejercicio. Estudios en ratones del grupo de Thomas Rando en Stanford, destacaron que el potencial regenerativo de los músculos esqueléticos disminuye con el envejecimiento, pero el ejercicio en forma de carrera mejora la funcionalidad de las células madre musculares y aumenta la capacidad de los músculos envejecidos para reparar lesiones en ratones en relación con una salida de la inactividad de las células madre (146). Además, durante el envejecimiento también se produce una disminución de la función muscular. En este sentido, un estudio llevado a cabo en la Universidad de Columbia indicó que el uso de osteocalcina podría restablecer la disminución de la función muscular y la pérdida de la capacidad de ejercicio relacionada con la edad. Los

niveles circulantes de osteocalcina disminuyen a partir de la mediana edad y aumentan después de correr. A nivel de las miofibras promueve la absorción de glucosa y ácidos grasos y su catabolismo para producir moléculas de ATP necesarias para la función muscular durante el ejercicio. Además, regula positivamente la liberación de IL-6 derivada del músculo que a su vez retroalimenta la liberación de osteocalcina por el hueso durante el ejercicio (147). La inyección de osteocalcina restaura la función muscular, aumenta la masa muscular y mejora la capacidad de ejercicio en ratones de edad avanzada (148).

Por otra parte, en diversas enfermedades metabólicas relacionadas con el envejecimiento y la senescencia celular, como la diabetes mellitus y las enfermedades cardiovasculares, la adopción de hábitos alimentarios saludables ha demostrado ser útil para frenar el proceso de envejecimiento y la disfunción celular. En este sentido y en relación con el papel de la dieta, se ha comprobado que su composición de nutrientes regula el equilibrio metabólico y modifica la esperanza de vida en diferentes especies. Experimentos en moscas realizados en la Universidad de Pittsburgh, destinados a analizar el papel del aminoácido no esencial tirosina en el envejecimiento, comprobaron que los niveles de tirosina disminuyen con la edad, acompañados de un aumento de las vías catabólicas de la tirosina. Sus análisis indican que la regulación negativa de las enzimas de degradación de la tirosina, incluida la tirosina aminotransferasa (TAT), alarga la esperanza de vida de dichos dípteros (149). Otros estudios en la Universidad de Wisconsin (150) también han contribuido a determinar cómo los aminoácidos esenciales de la dieta afectan la esperanza de vida en ratones, de manera que la restricción de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina) reduce la adiposidad, mejora la tolerancia a la glucosa y aumenta la salud metabólica (151). Además, otro grupo de la misma universidad demostró que para que la restricción calórica tenga un efecto beneficioso sobre la salud y la esperanza de vida es necesario el ayuno, detectando mediante el ayuno mejoras en la sensibilidad a la insulina. En concreto en humanos, investigadores de la Universidad de San Diego mostraron el papel beneficioso del ayuno en pacientes con enfermedad cardiometabólica (152), destacando además la importancia del ritmo circadiano para impulsar el metabolismo y contribuir a la eficiencia de las intervenciones.

Entre los patrones e índices dietéticos de los que se ha evaluado su asociación con enfermedades y alteraciones asociadas con la edad se encuentran las dietas de estilo mediterráneo, las pautas dietéticas de EE. UU. y el índice de alimentación saludable relacionado, el indicador de dieta saludable de la OMS, el índice inflamatorio dietético, dieta MIND (Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay) y dietas

con carbohidratos de bajo índice glucémico y altas en fibra. Se trata de perfiles dietéticos asociados con la prevención de las diversas condiciones asociadas con la edad citadas previamente (fragilidad y riesgo de caídas, osteoporosis, deterioro cognitivo, demencia, degeneración macular relacionada con la edad, cataratas, pérdida de audición, enfermedades no transmisibles y estreñimiento crónico) (138). En cuanto a los nutrientes específicos que se han asociado con la prevención del envejecimiento no saludable se han identificado:

- la ingesta de proteínas en las dosis diarias recomendadas actualmente previene la sarcopenia, la fragilidad y las caídas en combinación con el ejercicio (153).
- ingesta adecuada de proteínas asociadas a calcio y vitamina D previene la osteoporosis (154, 155).
- cereales integrales y fibra dietética previenen la diabetes tipo 2 y el estreñimiento crónico (156).

Por otra parte, se ha comprobado también que los efectos acumulativos de una nutrición saludable en etapas más tempranas de la vida favorecen el envejecimiento libre de enfermedades (157).

Los diferentes tipos de dieta citados comparten múltiples características comunes: consumo regular de verduras y frutas, cereales integrales, legumbres, nueces y semillas, mariscos y aceites de oliva y canola, y un bajo consumo de grasas saturadas y alimentos superfluos como las bebidas azucaradas. Es por ello que por el momento no disponemos de datos suficientes que permitan diferenciar claramente los efectos del consumo de cada uno de los patrones dietéticos saludables, aunque diferentes patrones pueden diferir en las porciones entre los distintos alimentos saludables que los componen, siendo a priori estas diferencias interesantes en el envejecimiento teniendo también en cuenta los menores requerimientos energéticos característicos de esta etapa de la vida.

En nuestro estudio, cuando analizamos globalmente toda la población, sin estratificar por el tipo de intervención dietética, los portadores del alelo minoritario C de SNP rs7069102 del gen *SIRT1* mostraron una disminución, después de 4 años, en la longitud de los telómeros, en contraste con el mantenimiento de la longitud de los telómeros objetivado en los homocigotos para el alelo común G. Por otro lado, aunque se observó una mejora generalizada de los parámetros de estrés oxidativo (LPO) e inflamación (TNF- α) en todos los participantes, dichos cambios fueron más favorables en los homocigotos GG. Un hallazgo interesante de nuestro estudio fue que la longitud de los

telómeros no difería en el basal atendiendo al citado polimorfismo. Ello indica la importancia de la interacción con la dieta, y en este caso el beneficio de ambos modelos de intervención impidiendo el acortamiento de la longitud telomérica que acompaña al proceso de envejecer. En un contexto similar, en relación con la dieta, Inamori t. et al (158) exploraron la asociación entre los SNP de *SIRT1* (rs7069102, rs2273773, rs3818292), sugiriendo que la combinación de variantes genéticas del gen *SIRT1* y los n-6 y/o n-3 de la dieta influyen en los niveles séricos de C-LDL y C-HDL. Además, en nuestro análisis, y separando por el tipo de dieta que han realizado ambos grupos de pacientes, observamos que los portadores de los alelos mutados tanto para el SNP rs7069102 como para rs1885472, tras el consumo de una dieta baja en grasas, presentaron beneficios en los parámetros asociados con el envejecimiento (longitud de los telómeros) e inflamación, que no se encontraron en los portadores de los alelos ancestrales, de manera que sufrieron un menor acortamiento telomérico y disminuyeron sus valores de TNF α y PCRus.

Las características de los ácidos grasos de la dieta, por sus diferentes propiedades, tienen una gran importancia ya que el grado de insaturación se relaciona con la susceptibilidad a la oxidación causada por las ERO, de manera que interviene en el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades crónicas (159). En este sentido, los beneficios que hallamos en nuestros resultados en relación con los parámetros de inflamación, estrés oxidativo y longitud telomérica podrían estar en relación con la composición grasa de nuestras dietas, por una parte la Dieta Mediterránea con su alto contenido en grasas saludables. Por otra, la dieta baja en grasa con la restricción en este grupo nutricional es la que mayores beneficios muestra. Una explicación posible de nuestros resultados es que ambos tipos de dieta presentan un bajo contenido en ácidos grasos saturados, componentes que en estudios previos se ha demostrado que incrementan los parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo. Otras características comunes a ambas dietas, como la baja densidad calórica y el alto contenido en fitonutrientes y antioxidantes también podrían explicar los hallazgos obtenidos.

Debemos tener en cuenta que las ERO son productos de la respiración mitocondrial y que por otra parte, los sistemas de defensa antioxidantes que contrarrestan el efecto de las ERO al inactivarlas, están formados por una serie de enzimas y compuestos antioxidantes tanto endógenos como provenientes de la dieta, y que su efecto se ve modificado por la predisposición genética individual. Resulta por tanto de interés el planteamiento de que componentes específicos de la dieta, a través de la modulación del estado inflamatorio, pudieran interactuar con las características genéticas de cada sujeto para determinar una diferente susceptibilidad al envejecimiento.

De hecho, durante el proceso de envejecimiento, existen evidencias que demuestran que los rasgos genéticos también determinan cambios a nivel celular como la apoptosis, el acortamiento telomérico y la actividad mitocondrial (160-162). Esto impacta directamente sobre los marcadores asociados con el estrés oxidativo (GSH y GSSG, LPO), la inflamación (TNF- α y PCRus) y la propia longitud de los telómeros.

Los aspectos del envejecimiento y de la senescencia celular que están guiados genéticamente (163, 164), son conocidos gracias al descubrimiento del papel de los denominados "genes de la longevidad" y de estrategias que interfieren, por ejemplo, con las sirtuinas, la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y la ingesta de calorías, frenando el proceso de envejecimiento (164), y que han permitido la identificación de SNP en varios genes que pueden afectar la esperanza de vida y las enfermedades relacionadas con la edad.

Según un estudio publicado por Lodato y cols., mediante la secuenciación del genoma completo unicelular encontraron que las neuronas posmitóticas acumulan mutaciones somáticas con la edad (165). Esta acumulación de mutaciones en SNP que se produce de forma lineal con el envejecimiento constituye lo que se denomina genosenio y puede permitirnos identificar dianas terapéuticas genéticas para prevenir la senescencia celular y favorecer el envejecimiento saludable.

En nuestro estudio hemos analizado la influencia de diferentes genes de los que es conocida su relación con el envejecimiento, como *SIRT*, *PINX1*, *TERC*, *TERT*, *TOMM40*, *APOE*, *APOC1*, *FOXO1A*, *FOXO3A*, *SIRT1*, *ADIPOQ*, *COQ7*, *COQ8*, *COQ9*.

El interés de *PINX1* en relación con el envejecimiento y la longitud telomérica radica en que regula la actividad de la telomerasa, mientras que *TERC* y *TERT* codifican componentes de la telomerasa. *TOMM40* codifica proteínas de la membrana mitocondrial. *APOE* y *APOC1* participan en el transporte y el metabolismo lipídico. Los genes *FOXO* intervienen en la regulación del perfil lipídico y glucémico. Los genes *COQ* regulan la coenzima Q, que participa en la producción energética a nivel de la cadena de transporte de electrones y tiene efecto antioxidante por su capacidad para adquirir formas reducidas y oxidadas. El gen *ADIPOQ* regula la adiponectina, implicada en el metabolismo energético y la sensibilidad a la insulina.

Por otra parte, las proteínas conocidas como sirtuinas, están implicadas en la apoptosis, la inflamación y la actividad mitocondrial, y se relacionan con la protección frente a la calcificación arterial, la regulación de la función mitocondrial, el sistema de defensa antioxidante y la tumorigenesis (166). Debido a las asociaciones encontradas en nuestro estudio, continuamos profundizando en su interés.

Estudios sobre los genes *SIRT* en mamíferos revelaron que *SIRT1* y *SIRT6* desempeñan un papel predominante en el proceso de envejecimiento, integrando una compleja red de vías de señalización relacionadas con el envejecimiento (166). Protegen contra las enfermedades relacionadas con el envejecimiento mediante la mejora del estrés celular y oxidativo, la inflamación, la autofagia, los daños al ADN y la disfunción metabólica. En animales, la activación inducida de *SIRT1* y *SIRT6* ha demostrado efectos beneficiosos en la aparición de enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

En concreto, aunque el genotipo rs7069102 del gen *SIRT1* se asoció previamente con el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares en sujetos sanos (158), no se había asociado hasta el momento con cambios en las características celulares relacionadas con la edad, como la longitud de los telómeros. Con respecto al SNP rs1885472, hay poca evidencia previa sobre su potencial relación con el proceso de envejecimiento, la enfermedad y cómo contribuyen los factores ambientales, entre ellos principalmente la dieta. Dada su alta LD con el SNP rs7069102 nos ha permitido corroborar los resultados obtenidos con el rs7069102 apoyando las asociaciones encontradas.

Pese a que se van conociendo mejor los determinantes genéticos del envejecimiento, todavía es necesario aclarar el papel concreto de numerosos genes involucrados y sus cascadas efectoras, como sí se ha caracterizado más en detalle con los procesos de desarrollo y apoptosis. Los resultados hallados en los análisis de *FOXO3A* y *TERC* contribuyen a identificar otras variantes genéticas que se asocian a una menor longitud de los telómeros, y pueden condicionar una mayor susceptibilidad al envejecimiento prematuro, que también podría dar lugar a medidas preventivas en el contexto de la medicina de precisión.

Tal como se ha comentado con anterioridad, el acortamiento de los telómeros con cada ciclo de división celular es un factor clave de la senescencia celular ya que cuando se alcanza una longitud mínima crítica se inicia una respuesta al daño al ADN que implica la detención final de la proliferación (167). Sin embargo, la longitud absoluta de los telómeros en diferentes especies e incluso entre individuos puede variar mucho independientemente de la edad y no está claramente correlacionada con la esperanza de vida (168, 169) por lo que el papel de la longitud absoluta de los telómeros sobre el envejecimiento aún no está claro. En cambio, sí que se ha comprobado que su tasa de acortamiento podría ser un mejor marcador que relacione los telómeros con el proceso de envejecimiento (143). Nuestro estudio refleja dicho ritmo de acortamiento, ya que

disponemos de medidas de longitud de telómeros en dos momentos diferentes separados en el tiempo por cuatro años, lo que permite conocer su evolución como marcador del ritmo de envejecimiento.

Otra cuestión interesante para analizar es si el envejecimiento es o no reversible. Resulta difícil creer que la senescencia en tejidos individuales pueda ser reversible, ya que supondría un cambio en el estado celular en lugar de la eliminación de las células por senolisis, aún más teniendo en cuenta las implicaciones del proceso de senescencia en la supresión tumoral (170). Un estudio reciente del grupo de Leikam demostró que un estado de senescencia inducida por oncogenes (detención estable del ciclo celular con un fenotipo binuclear o multinuclear que se considera una barrera para la progresión del cáncer) puede ser revertido de manera que las células diferenciadas conducidas a la senescencia por el oncogén dan lugar a la transformación del tumor en células altamente agresivas, que son células madre mononucleadas surgidas a partir de células senescentes (170).

Hay que tener en cuenta que el proceso de envejecimiento está llegando a ser objeto de gran interés académico e industrial por las potenciales intervenciones para modificarlo desde el punto de vista farmacológico y por el impacto de dicha modificación sobre la sociedad y la economía, por lo que nuestros hallazgos son de gran interés.

Las principales estrategias estudiadas hasta el momento para modificar o intentar revertir el proceso de envejecimiento se basan en intentar desacelerar o reprogramar el proceso de manera que permita aumentar la longevidad y la calidad de vida en la ancianidad teniendo en cuenta la participación tanto de los factores exógenos como de los genéticos susceptibles de intervención.

La intervención analizada en nuestro estudio permite conocer mejor estrategias para prevenir el envejecimiento identificando perfiles de pacientes, como son los pacientes de alto riesgo cardiovascular y homocigotos para el alelo G del SNP rs7069102 del gen SIRT1 que se benefician específicamente de la dieta baja en grasas para mejorar su proceso de envejecimiento.

Entre las intervenciones no genéticas, la restricción calórica en modelos animales prolonga la longevidad y protege frente a la aparición de enfermedades crónicas mediante una respuesta de estrés adaptativo con funciones antioxidantes y antiinflamatorias (171), además de que entre sus efectos pleiotrópicos activa los genes *SIRT*.

En cuanto a las intervenciones genéticas dirigidas a la reprogramación del envejecimiento mediante la regulación de sirtuinas o las vías relacionadas con mTOR (efectores también en la restricción calórica), también han demostrado su papel en la mejora del proceso de envejecimiento y en la esperanza de vida en diferentes modelos animales (171-173).

La sobreexpresión de la enzima telomerasa es otro de los medios empleados en organismos envejecidos para lograr el rejuvenecimiento. Durante el desarrollo embrionario la actividad de la telomerasa es alta, pero posteriormente va disminuyendo. Su sobreexpresión revierte varios fenotipos de envejecimiento en diferentes tejidos y aumenta la longevidad (10) aunque todavía no están claro si dicha mejoría se debe a la estabilización de la longitud de los telómeros o a otras funciones de la telomerasa (174). Dado que la mayoría de nuestras células se encuentran en estado postmitótico, tal como se comentó previamente, se plantea que sea la acumulación de daño en los telómeros más allá de su acortamiento lo que contribuya al desarrollo de un fenotipo de envejecimiento a lo largo de la vida. Todavía no está claro si la actividad de la telomerasa puede reparar la disfunción de los telómeros además de su acortamiento.

Otras estrategias que logren la manipulación genética y epigenética, como la modificación de determinados SNP también podrían modificar el proceso de envejecimiento.

Los nuevos enfoques terapéuticos planteados cuentan con el inconveniente de que la senescencia es también un proceso fisiológico con una vertiente beneficiosa, ya que aumenta la homeostasis de los tejidos como ocurre con los procesos de regeneración y plasticidad entre otros (175) por lo que fármacos senolíticos dirigidos a células senescentes sin discriminar entre programas de senescencia beneficiosos y perjudiciales pueden resultar nocivos (73).

Finalmente, nuestro estudio tiene ciertas limitaciones y también fortalezas. Se realizó en una población con enfermedad cardiovascular establecida, lo que sugiere que nuestros resultados deben extrapolarse cuidadosamente a la población general. En nuestro estudio analizamos la longitud de los telómeros durante un período de tiempo determinado, lo que no permite inferir el efecto de la dieta y otros fenómenos relacionados con el envejecimiento previos a la intervención sobre los parámetros analizados. Aunque es difícil plantear estudios de intervención a esta escala, sería interesante replicar estos hallazgos, al menos en cohortes que contengan esta información y se pueda ver su evolución a lo largo del tiempo.

Por otra parte, en nuestro estudio los datos que se analizan son los de longitud media de telómeros y no la abundancia de telómeros cortos. Pero algunos estudios genéticos en modelos animales sugieren la posibilidad de que la abundancia de telómeros cortos en lugar de la longitud promedio de los telómeros es la causante de ciertas enfermedades crónicas relacionadas con el envejecimiento (176, 177) y que es un mejor indicador de la disfunción de los telómeros y, en consecuencia, de la disfunción celular y tisular (78).

En cuanto a las fortalezas, nuestro estudio tiene un gran tamaño muestral y una larga duración. Tanto el seguimiento como la adherencia a ambos tipos de dieta han sido muy buenos. Se trata de un estudio aleatorizado y unicéntrico, lo que ha permitido una atención homogénea y estandarizada.

En resumen, nuestros resultados apoyan la noción de que la dieta saludable interactúa con determinados SNP, en concreto el rs7069102 del gen *SIRT1*, para condicionar un mejor perfil de envejecimiento en pacientes de alto riesgo cardiovascular, que se manifiesta como una mejoría en el ritmo de acortamiento telomérico, y un descenso de TNF α y PCRus. Estos hallazgos sugieren que el ritmo de senescencia biológica puede ser modulado por la dieta de forma personalizada.

VIII. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRINCIPAL:

El consumo crónico, durante 4 años, de una alimentación Mediterránea, rica en aceite de oliva (38% de calorías en forma de grasa, con 22% MUFA), o una dieta pobre en grasa, (<28% de calorías en forma de grasa, 12% como MUFA), en pacientes con enfermedad cardiovascular, interacciona con el polimorfismo rs7069102 del gen SIRT1 para condicionar la longitud telomérica. Así, en nuestro estudio, los homocigotos GG para el SNP rs7069102 del gen SIRT1 se benefician de una dieta baja en grasas para retardar el acortamiento de los telómeros. Este hecho podría ayudar a ofrecer a nuestros pacientes una dieta personalizada y adaptada a sus características genéticas, lo que nos permitirá ralentizar el proceso de envejecimiento y sus enfermedades relacionadas mejorando los parámetros relacionados con el estrés oxidativo y la inflamación.

CONCLUSIÓN SECUNDARIA:

No encontramos interacción significativa entre la dieta y otros factores como el sexo, el consumo de tabaco y el consumo de alcohol y la evolución de la longitud de telómeros en nuestro grupo de pacientes.

IX. ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosín difosfato

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: adenosín trifosfato

C-HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad

C-LDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad

CORDIOPREV: Coronary Diet Intervention With Olive Oil and Cardiovascular Prevention

CpG: guaninas fosfato de citosina

ERO: especies reactivas el oxígeno

IFN α : interferón alfa

IGF: factor de crecimiento similar a insulina tipo 1

IL: interleucina

IMC: índice de masa corporal

ISS: vía de señalización de insulina

LD: desequilibrio de ligamiento

miARN: micro ARN

mTOR: mamalian Target of Rapamycin

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida

NT-proBNP: fracción N terminal de propéptido natriurético cerebral

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCRus: proteína C reactiva ultrasensible

qPCR: PCR cuantitativa

SIRT: sirtuínas

TG: triglicéridos

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

TRF: fragmentos de restricción terminal

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Schmauck-Medina T, Moliere A, Lautrup S, Zhang J, Chlopicki S, Madsen HB, et al. New hallmarks of ageing: a 2022 Copenhagen ageing meeting summary. *Aging (Albany NY)*. 2022;14(16):6829-39.
2. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
3. Dolle D. Aging under the microscope: a biological quest: National Institutes of Health, National Institute on Aging, Office of ...; 2002.
4. Gems D, de Magalhaes JP. The hoverfly and the wasp: A critique of the hallmarks of aging as a paradigm. *Ageing Res Rev*. 2021;70:101407.
5. Fraser HC, Kuan V, Johnen R, Zwierzyna M, Hingorani AD, Beyer A, Partridge L. Biological mechanisms of aging predict age-related disease co-occurrence in patients. *Aging Cell*. 2022;21(4):e13524.
6. Baker DJ, Dawlaty MM, Wijshake T, Jeganathan KB, Malureanu L, van Ree JH, et al. Increased expression of BubR1 protects against aneuploidy and cancer and extends healthy lifespan. *Nat Cell Biol*. 2013;15(1):96-102.
7. Pawelczak KS, Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, Turchi JJ. Modulating DNA Repair Pathways to Improve Precision Genome Engineering. *ACS Chem Biol*. 2018;13(2):389-96.
8. Barakat K, Gajewski M, Tuszyński JA. DNA repair inhibitors: the next major step to improve cancer therapy. *Curr Top Med Chem*. 2012;12(12):1376-90.
9. Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med*. 2006;12(10):1133-8.
10. Jaskelioff M, Muller FL, Paik JH, Thomas E, Jiang S, Adams AC, et al. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*. 2011;469(7328):102-6.
11. Kanfi Y, Peshti V, Gil R, Naiman S, Nahum L, Levin E, et al. SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity. *Aging Cell*. 2010;9(2):162-73.
12. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006;124(2):315-29.
13. Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, Shen L, Zhang L, Zhang J, et al. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res*. 2010;20(3):332-40.

14. Oberdoerffer P, Sinclair DA. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):692-702.
15. Tsurumi A, Li WX. Global heterochromatin loss: a unifying theory of aging? *Epigenetics.* 2012;7(7):680-8.
16. Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet.* 2007;8(4):299-309.
17. Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, Blasco MA. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 2006;8(4):416-24.
18. Bahar R, Hartmann CH, Rodriguez KA, Denny AD, Busuttill RA, Dolle ME, et al. Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature.* 2006;441(7096):1011-4.
19. Harries LW, Hernandez D, Henley W, Wood AR, Holly AC, Bradley-Smith RM, et al. Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. *Aging Cell.* 2011;10(5):868-78.
20. Nicholas A, de Magalhaes JP, Kraytsberg Y, Richfield EK, Levanon EY, Khrapko K. Age-related gene-specific changes of A-to-I mRNA editing in the human brain. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(6):445-7.
21. Freije JM, Lopez-Otin C. Reprogramming aging and progeria. *Curr Opin Cell Biol.* 2012;24(6):757-64.
22. Rando TA, Chang HY. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell.* 2012;148(1-2):46-57.
23. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science.* 2011;333(6046):1109-12.
24. Lopez-Otin C, Kroemer G. Hallmarks of Health. *Cell.* 2021;184(1):33-63.
25. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell.* 2023;186(2):243-78.
26. Haigis MC, Yankner BA. The aging stress response. *Molecular cell.* 2010;40(2):333-44.
27. Tsakiri EN, Iliaki KK, Hohn A, Grimm S, Papassideri IS, Grune T, Trougakos IP. Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces life span in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:1155-63.
28. Bourdenx M, Martin-Segura A, Scrivo A, Rodriguez-Navarro JA, Kaushik S, Tasset I, et al. Chaperone-mediated autophagy prevents collapse of the neuronal metastable proteome. *Cell.* 2021;184(10):2696-714 e25.

29. Martinez-Miguel VE, Lujan C, Espie-Caullet T, Martinez-Martinez D, Moore S, Backes C, et al. Increased fidelity of protein synthesis extends lifespan. *Cell Metab.* 2021;33(11):2288-300 e12.
30. Bobkova NV, Evgen'ev M, Garbuz DG, Kulikov AM, Morozov A, Samokhin A, et al. Exogenous Hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(52):16006-11.
31. Hafycz JM, Strus E, Naidoo N. Reducing ER stress with chaperone therapy reverses sleep fragmentation and cognitive decline in aged mice. *Aging Cell.* 2022;21(6):e13598.
32. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science.* 2010;328(5976):321-6.
33. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature.* 2009;460(7253):392-5.
34. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2007;8(9):729-40.
35. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell.* 2007;130(2):223-33.
36. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010;24(22):2463-79.
37. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011;192(4):547-56.
38. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med.* 2018;24(8):1246-56.
39. Lin B, Coleman JH, Peterson JN, Zunitch MJ, Jang W, Herrick DB, Schwob JE. Injury Induces Endogenous Reprogramming and Dedifferentiation of Neuronal Progenitors to Multipotency. *Cell Stem Cell.* 2017;21(6):761-74 e5.
40. Tata PR, Rajagopal J. Plasticity in the lung: making and breaking cell identity. *Development.* 2017;144(5):755-66.
41. Lu Y, Brommer B, Tian X, Krishnan A, Meer M, Wang C, et al. Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature.* 2020;588(7836):124-9.
42. Doeser MC, Scholer HR, Wu G. Reduction of Fibrosis and Scar Formation by Partial Reprogramming In Vivo. *Stem Cells.* 2018;36(8):1216-25.
43. Hishida T, Yamamoto M, Hishida-Nozaki Y, Shao C, Huang L, Wang C, et al. In vivo partial cellular reprogramming enhances liver plasticity and regeneration. *Cell Rep.* 2022;39(4):110730.

44. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149(2):274-93.
45. Russell SJ, Kahn CR. Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):681-91.
46. Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, et al. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature*. 2013;497(7448):211-6.
47. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(6):365-81.
48. Deretic V, Kroemer G. Autophagy in metabolism and quality control: opposing, complementary or interlinked functions? *Autophagy*. 2022;18(2):283-92.
49. Cassidy LD, Young ARJ, Young CNJ, Soilleux EJ, Fielder E, Weigand BM, et al. Temporal inhibition of autophagy reveals segmental reversal of ageing with increased cancer risk. *Nat Commun*. 2020;11(1):307.
50. Zmora N, Soffer E, Elinav E. Transforming medicine with the microbiome. *Sci Transl Med*. 2019;11(477).
51. Leonardi GC, Accardi G, Monastero R, Nicoletti F, Libra M. Ageing: from inflammation to cancer. *Immun Ageing*. 2018;15:1.
52. Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):505-22.
53. Shapiro H, Thaiss CA, Levy M, Elinav E. The cross talk between microbiota and the immune system: metabolites take center stage. *Current opinion in immunology*. 2014;30:54-62.
54. Yuan F, Hankey W, Wagner EJ, Li W, Wang Q. Alternative polyadenylation of mRNA and its role in cancer. *Genes & Diseases*. 2021;8(1):61-72.
55. Shen T, Li H, Song Y, Li L, Lin J, Wei G, Ni T. Alternative polyadenylation dependent function of splicing factor SRSF3 contributes to cellular senescence. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(5):1356-88.
56. Cooper R, Kuh D, Hardy R, Group MR. Objectively measured physical capability levels and mortality: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2010;341.
57. Ruff RM, Parker SB. Gender- and age-specific changes in motor speed and eye-hand coordination in adults: normative values for the Finger Tapping and Grooved Pegboard Tests. *Percept Mot Skills*. 1993;76(3 Pt 2):1219-30.
58. Studenski S, Perera S, Patel K, Rosano C, Faulkner K, Inzitari M, et al. Gait speed and survival in older adults. *JAMA*. 2011;305(1):50-8.

59. Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2002;50(5):889-96.
60. Koster A, Ding J, Stenholm S, Caserotti P, Houston DK, Nicklas BJ, et al. Does the amount of fat mass predict age-related loss of lean mass, muscle strength, and muscle quality in older adults? *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2011;66(8):888-95.
61. Gallucci M, Mazzuco S, Ongaro F, Di Giorgi E, Mecocci P, Cesari M, et al. Body mass index, lifestyles, physical performance and cognitive decline: the "Treviso Longeva (TRELONG)" study. *J Nutr Health Aging*. 2013;17(4):378-84.
62. Prospective Studies C, Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, et al. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet*. 2007;370(9602):1829-39.
63. Lewington S. Prospective studies collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360:1903-13.
64. Perez-Caballero AI, Alcalá-Díaz JF, Perez-Martínez P, García-Ríos A, Delgado-Casado N, Marin C, et al. Lipid metabolism after an oral fat test meal is affected by age-associated features of metabolic syndrome, but not by age. *Atherosclerosis*. 2013;226(1):258-62.
65. Visser M, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB, et al. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2002;57(5):M326-M32.
66. Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys M, Thompson S, Collins R, Danesh J. Emerging Risk Factors Collaboration C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9709):132-40.
67. Kabagambe EK, Judd SE, Howard VJ, Zakai NA, Jenny NS, Hsieh M, et al. Inflammation biomarkers and risk of all-cause mortality in the reasons for geographic and racial differences in stroke cohort. *American journal of epidemiology*. 2011;174(3):284-92.
68. Salvioli S, Capri M, Bucci L, Lanni C, Racchi M, Uberti D, et al. Why do centenarians escape or postpone cancer? The role of IGF-1,

inflammation and p53. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2009;58:1909-17.

69. Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology. *Nutrients*. 2016;8(6).

70. Park DC, Yeo SG. Aging. *Korean J Audiol*. 2013;17(2):39-44.

71. Marioni RE, Harris SE, Shah S, McRae AF, von Zglinicki T, Martin-Ruiz C, et al. The epigenetic clock and telomere length are independently associated with chronological age and mortality. *Int J Epidemiol*. 2018;47(1):356.

72. LaPak KM, Burd CE. The molecular balancing act of p16(INK4a) in cancer and aging. *Mol Cancer Res*. 2014;12(2):167-83.

73. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-53.

74. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*. 1961;25(3):585-621.

75. . !!! INVALID CITATION !!! 2,3.

76. Fouquerel E, Barnes RP, Uttam S, Watkins SC, Bruchez MP, Opresko PL. Targeted and Persistent 8-Oxoguanine Base Damage at Telomeres Promotes Telomere Loss and Crisis. *Mol Cell*. 2019;75(1):117-30.e6.

77. Barnes RP, de Rosa M, Thosar SA, Detwiler AC, Roginskaya V, Van Houten B, et al. Telomeric 8-oxo-guanine drives rapid premature senescence in the absence of telomere shortening. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2022;29(7):639-52.

78. Vera E, Blasco MA. Beyond average: potential for measurement of short telomeres. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(6):379-92.

79. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence,(TTAGGG) n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988;85(18):6622-6.

80. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet*. 1996;5(5):685-91.

81. Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol*. 1998;16(8):743-7.

82. Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(13):5300-5.

83. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(10):e47.
84. Demissie S, Levy D, Benjamin EJ, Cupples LA, Gardner JP, Herbert A, et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell.* 2006;5(4):325-30.
85. Delgado-Lista J, Alcala-Diaz JF, Torres-Peña JD, Quintana-Navarro GM, Fuentes F, Garcia-Rios A, et al. Long-term secondary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet and a low-fat diet (CORDIOPREV): a randomised controlled trial. *The Lancet.* 2022;399(10338):1876-85.
86. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med.* 2018;378(25):e34.
87. Galie S, Canudas S, Muralidharan J, Garcia-Gavilan J, Bullo M, Salas-Salvado J. Impact of Nutrition on Telomere Health: Systematic Review of Observational Cohort Studies and Randomized Clinical Trials. *Adv Nutr.* 2020;11(3):576-601.
88. Dolinsky VW, Dyck JR. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(11):1477-89.
89. Eyre H, Kahn R, Robertson RM, Clark NG, Doyle C, Hong Y, et al. Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes: a common agenda for the American Cancer Society, the American Diabetes Association, and the American Heart Association. *Stroke.* 2004;35(8):1999-2010.
90. Weiss EP, Fontana L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(4):H1205-19.
91. Willcox DC, Scapagnini G, Willcox BJ. Healthy aging diets other than the Mediterranean: a focus on the Okinawan diet. *Mech Ageing Dev.* 2014;136-137:148-62.
92. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(2):341-54.
93. Hu FB. Globalization of food patterns and cardiovascular disease risk. *Circulation.* 2008;118(19):1913-4.
94. Popkin BM. Urbanization, lifestyle changes and the nutrition transition. *World development.* 1999;27(11):1905-16.
95. Nishida C, Uauy R, Kumanyika S, Shetty P. The joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic

diseases: process, product and policy implications. *Public health nutrition*. 2004;7(1a):245-50.

96. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med*. 2003;348(26):2599-608.

97. Arvanitakis Z, Shah RC, Bennett DA. Diagnosis and Management of Dementia: Review. *JAMA*. 2019;322(16):1589-99.

98. Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T, Bueno-de-Mesquita B, Ocké MC, Peeters PH, et al. Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *Bmj*. 2005;330(7498):991.

99. Di Renzo L, Marsella LT, Carraro A, Valente R, Gualtieri P, Gratteri S, et al. Changes in LDL Oxidative Status and Oxidative and Inflammatory Gene Expression after Red Wine Intake in Healthy People: A Randomized Trial. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:317348.

100. Carruba G, Cocciadiferro L, Di Cristina A, Granata OM, Dolcemascolo C, Campisi I, et al. Nutrition, aging and cancer: lessons from dietary intervention studies. *Immun Ageing*. 2016;13:13.

101. Canudas S, Becerra-Tomas N, Hernandez-Alonso P, Galie S, Leung C, Crous-Bou M, et al. Mediterranean Diet and Telomere Length: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr*. 2020;11(6):1544-54.

102. Kondo T, Hirose M, Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(5):532-8.

103. Meinila J, Perala MM, Kautiainen H, Mannisto S, Kanerva N, Shivappa N, et al. Healthy diets and telomere length and attrition during a 10-year follow-up. *Eur J Clin Nutr*. 2019;73(10):1352-60.

104. Garcia-Calzon S, Martinez-Gonzalez MA, Razquin C, Aros F, Lapetra J, Martinez JA, et al. Mediterranean diet and telomere length in high cardiovascular risk subjects from the PREDIMED-NAVARRA study. *Clin Nutr*. 2016;35(6):1399-405.

105. Angelakopoulou A, Shah T, Sofat R, Shah S, Berry DJ, Cooper J, et al. Comparative analysis of genome-wide association studies signals for lipids, diabetes, and coronary heart disease: Cardiovascular Biomarker Genetics Collaboration. *European heart journal*. 2012;33(3):393-407.

106. Corsetti JP, Gansevoort RT, Navis G, Sparks CE, Dullaart RP. LPL polymorphism (D9N) predicts cardiovascular disease risk directly and through interaction with CETP polymorphism (TaqIB) in women with high HDL cholesterol and CRP. *Atherosclerosis*. 2011;214(2):373-6.

107. Vasto S, Candore G, Duro G, Lio D, Grimaldi MP, Caruso C. Alzheimer's disease and genetics of inflammation: a pharmacogenomic vision. 2007.
108. Finch CE. Evolution of the human lifespan, past, present, and future: phases in the evolution of human life expectancy in relation to the inflammatory load. *Proceedings of the American Philosophical Society*. 2012;156(1):9-44.
109. Bin-Jumah MN, Nadeem MS, Gilani SJ, Al-Abbasi FA, Ullah I, Alzarea SI, et al. Genes and Longevity of Lifespan. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3).
110. Li X, Liu L, Li T, Liu M, Wang Y, Ma H, et al. SIRT6 in Senescence and Aging-Related Cardiovascular Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:641315.
111. Singh V, Ubaid S. Role of Silent Information Regulator 1 (SIRT1) in Regulating Oxidative Stress and Inflammation. *Inflammation*. 2020;43(5):1589-98.
112. Hidalgo-Moyano C, Rangel-Zuniga OA, Gomez-Delgado F, Alcalá-Díaz JF, Rodríguez-Cantalejo F, Yubero-Serrano EM, et al. Diet and SIRT1 Genotype Interact to Modulate Aging-Related Processes in Patients with Coronary Heart Disease: From the CORDIOPREV Study. *Nutrients*. 2022;14(18).
113. Chalkiadaki A, Guarente L. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell Metab*. 2012;16(2):180-8.
114. Russo MA, Sansone L, Polletta L, Runci A, Rashid MM, De Santis E, et al. Sirtuins and resveratrol-derived compounds: a model for understanding the beneficial effects of the Mediterranean diet. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2014;14(4):300-8.
115. Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(3):138-45.
116. Wenzel U. Nutrition, sirtuins and aging. *Genes Nutr*. 2006;1(2):85-93.
117. Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol*. 2007;21(8):1745-55.
118. Gong H, Pang J, Han Y, Dai Y, Dai D, Cai J, Zhang TM. Age-dependent tissue expression patterns of Sirt1 in senescence-accelerated mice. *Mol Med Rep*. 2014;10(6):3296-302.
119. Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2001;410(6825):227-30.
120. Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvari M, Piper MD, et al. Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature*. 2011;477(7365):482-5.

121. Viswanathan M, Guarente L. Regulation of *Caenorhabditis elegans* lifespan by sir-2.1 transgenes. *Nature*. 2011;477(7365):E1-2.
122. Sebastian C, Satterstrom FK, Haigis MC, Mostoslavsky R. From sirtuin biology to human diseases: an update. *J Biol Chem*. 2012;287(51):42444-52.
123. Herranz D, Munoz-Martin M, Canamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, Serrano M. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun*. 2010;1:3.
124. Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, et al. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature*. 2012;483(7388):218-21.
125. Xie J, Zhang X, Zhang L. Negative regulation of inflammation by SIRT1. *Pharmacol Res*. 2013;67(1):60-7.
126. Gillum MP, Kotas ME, Erion DM, Kursawe R, Chatterjee P, Nead KT, et al. SirT1 regulates adipose tissue inflammation. *Diabetes*. 2011;60(12):3235-45.
127. Zhang Z, Lowry SF, Guarente L, Haimovich B. Roles of SIRT1 in the acute and restorative phases following induction of inflammation. *J Biol Chem*. 2010;285(53):41391-401.
128. Kawahara TL, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*. 2009;136(1):62-74.
129. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, Alcala-Diaz JF, Perez-Caballero AI, Gomez-Delgado F, et al. CORonary Diet Intervention with Olive oil and cardiovascular PREvention study (the CORDIOPREV study): Rationale, methods, and baseline characteristics: A clinical trial comparing the efficacy of a Mediterranean diet rich in olive oil versus a low-fat diet on cardiovascular disease in coronary patients. *Am Heart J*. 2016;177:42-50.
130. Quintana-Navarro GM, Alcala-Diaz JF, Lopez-Moreno J, Perez-Corral I, Leon-Acuna A, Torres-Pena JD, et al. Long-term dietary adherence and changes in dietary intake in coronary patients after intervention with a Mediterranean diet or a low-fat diet: the CORDIOPREV randomized trial. *Eur J Nutr*. 2020;59(5):2099-110.
131. Rangel-Zuniga OA, Corina A, Lucena-Porras B, Cruz-Teno C, Gomez-Delgado F, Jimenez-Lucena R, et al. TNFA gene variants related to the inflammatory status and its association with cellular aging: From the CORDIOPREV study. *Exp Gerontol*. 2016;83:56-62.

132. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
133. Machek D. Is the Life of a Mediocre Philosopher Better Than the Life of an Excellent Cobbler? Aristotle on the Value of Activity in *Nicomachean Ethics* x.4-8. *J Value Inq.* 2023;57(1):71-87.
134. Mokdad AH, Ballestros K, Echko M, Glenn S, Olsen HE, Mullany E, et al. The state of US health, 1990-2016: burden of diseases, injuries, and risk factors among US states. *Jama.* 2018;319(14):1444-72.
135. Kaeberlein M. How healthy is the healthspan concept? *Geroscience.* 2018;40(4):361-4.
136. Beard JR, Officer A, de Carvalho IA, Sadana R, Pot AM, Michel JP, et al. The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. *Lancet.* 2016;387(10033):2145-54.
137. Chang AY, Skirbekk VF, Tyrovolas S, Kassebaum NJ, Dieleman JL. Measuring population ageing: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Public Health.* 2019;4(3):e159-e67.
138. Roberts SB, Silver RE, Das SK, Fielding RA, Gilhooly CH, Jacques PF, et al. Healthy Aging-Nutrition Matters: Start Early and Screen Often. *Adv Nutr.* 2021;12(4):1438-48.
139. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:685-705.
140. Gladyshev TV, Gladyshev VN. A Disease or Not a Disease? Aging As a Pathology. *Trends Mol Med.* 2016;22(12):995-6.
141. Galkin F, Zhang B, Dmitriev SE, Gladyshev VN. Reversibility of irreversible aging. *Ageing Res Rev.* 2019;49:104-14.
142. Hayflick L. The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation. *Exp Cell Res.* 1961;23:14-20.
143. Ain Q, Schmeer C, Penndorf D, Fischer M, Bondeva T, Forster M, et al. Cell cycle-dependent and -independent telomere shortening accompanies murine brain aging. *Aging (Albany NY).* 2018;10(11):3397-420.
144. Jurk D, Wang C, Miwa S, Maddick M, Korolchuk V, Tsolou A, et al. Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell.* 2012;11(6):996-1004.
145. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol.* 2018;217(1):65-77.
146. Brett JO, Arjona M, Ikeda M, Quarta M, de Morree A, Egner IM, et al. Exercise rejuvenates quiescent skeletal muscle stem cells in old









- mice through restoration of Cyclin D1. *Nature metabolism*. 2020;2(4):307-17.
147. Mera P, Laue K, Ferron M, Confavreux C, Wei J, Galán-Díez M, et al. Osteocalcin signaling in myofibers is necessary and sufficient for optimum adaptation to exercise. *Cell metabolism*. 2016;23(6):1078-92.
148. Yuan L, Chang M, Wang J. Abdominal obesity, body mass index and the risk of frailty in community-dwelling older adults: a systematic review and meta-analysis. *Age Ageing*. 2021;50(4):1118-28.
149. Parkhitko AA, Ramesh D, Wang L, Leshchiner D, Filine E, Binari R, et al. Downregulation of the tyrosine degradation pathway extends *Drosophila* lifespan. *Elife*. 2020;9.
150. Green CL, Lamming DW. Regulation of metabolic health by essential dietary amino acids. *Mech Ageing Dev*. 2019;177:186-200.
151. Fontana L, Cummings NE, Arriola Apelo SI, Neuman JC, Kasza I, Schmidt BA, et al. Decreased Consumption of Branched-Chain Amino Acids Improves Metabolic Health. *Cell Rep*. 2016;16(2):520-30.
152. Wilkinson MJ, Manoogian ENC, Zadourian A, Lo H, Fakhouri S, Shoghi A, et al. Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2020;31(1):92-104 e5.
153. Beasley JM, LaCroix AZ, Neuhaus ML, Huang Y, Tinker L, Woods N, et al. Protein intake and incident frailty in the Women's Health Initiative observational study. *J Am Geriatr Soc*. 2010;58(6):1063-71.
154. Heaney RP. Calcium, dairy products and osteoporosis. *J Am Coll Nutr*. 2000;19(2 Suppl):83S-99S.
155. Hanley DA, Cranney A, Jones G, Whiting SJ, Leslie WD, Cole DE, et al. Vitamin D in adult health and disease: a review and guideline statement from Osteoporosis Canada. *CMAJ*. 2010;182(12):E610-8.
156. de Vries J, Miller PE, Verbeke K. Effects of cereal fiber on bowel function: A systematic review of intervention trials. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8952-63.
157. Shishtar E, Rogers GT, Blumberg JB, Au R, Jacques PF. Long-term dietary flavonoid intake and risk of Alzheimer disease and related dementias in the Framingham Offspring Cohort. *Am J Clin Nutr*. 2020;112(2):343-53.
158. Inamori T, Goda T, Kasezawa N, Yamakawa-Kobayashi K. The combined effects of genetic variation in the SIRT1 gene and dietary intake of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on serum LDL-C and HDL-C levels: a population based study. *Lipids Health Dis*. 2013;12:4.

159. Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr.* 1985;5:365-90.
160. Gomez-Delgado F, Delgado-Lista J, Lopez-Moreno J, Rangel-Zuniga OA, Alcalá-Díaz JF, Leon-Acuna A, et al. Telomerase RNA Component Genetic Variants Interact With the Mediterranean Diet Modifying the Inflammatory Status and its Relationship With Aging: CORDIOPREV Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018;73(3):327-32.
161. Passos JF, Saretzki G, von Zglinicki T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.* 2007;35(22):7505-13.
162. Salpea KD, Talmud PJ, Cooper JA, Maubaret CG, Stephens JW, Abelak K, Humphries SE. Association of telomere length with type 2 diabetes, oxidative stress and UCP2 gene variation. *Atherosclerosis.* 2010;209(1):42-50.
163. Adler AS, Kawahara TL, Segal E, Chang HY. Reversal of aging by NF-kappaB blockade. *Cell Cycle.* 2008;7(5):556-9.
164. Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K. SIRT1 longevity factor suppresses NF-kappaB -driven immune responses: regulation of aging via NF-kappaB acetylation? *Bioessays.* 2008;30(10):939-42.
165. Lodato MA, Rodin RE, Bohrson CL, Coulter ME, Barton AR, Kwon M, et al. Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *Science.* 2018;359(6375):555-9.
166. You Y, Liang W. SIRT1 and SIRT6: The role in aging-related diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2023;1869(7):166815.
167. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 2003;426(6963):194-8.
168. Whittemore K, Vera E, Martínez-Nevado E, Sanpera C, Blasco MA. Telomere shortening rate predicts species life span. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(30):15122-7.
169. Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, et al. Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Experimental gerontology.* 2002;37(4):523-31.
170. Chakradeo S, W Elmore L, A Gewirtz D. Is senescence reversible? *Current drug targets.* 2016;17(4):460-6.
171. López-Lluch G, Navas P. Calorie restriction as an intervention in ageing. *The Journal of physiology.* 2016;594(8):2043-60.

172. Guarente L. Sirtuins, aging, and metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011;76:81-90.
173. Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev.* 2013;27(19):2072-85.
174. Romaniuk A, Paszel-Jaworska A, Toton E, Lisiak N, Holysz H, Krolak A, et al. The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off. *Mol Biol Rep.* 2019;46(1):1401-11.
175. Prata L, Ovsyannikova IG, Tchkonja T, Kirkland JL. Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities. *Semin Immunol.* 2018;40:101275.
176. Samper E, Flores JM, Blasco MA. Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*^{-/-} mice with short telomeres. *EMBO Rep.* 2001;2(9):800-7.
177. Hemann MT, Strong MA, Hao L-Y, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell.* 2001;107(1):67-77.

Article

Diet and *SIRT1* Genotype Interact to Modulate Aging-Related Processes in Patients with Coronary Heart Disease: From the CORDIOPREV Study

Cristina Hidalgo-Moyano ^{1,2,3,†}, Oriol Alberto Rangel-Zuñiga ^{1,2,3,4,†} , Francisco Gomez-Delgado ⁵, Juan F. Alcalá-Díaz ^{1,2,3,4} , Fernando Rodríguez-Cantalejo ⁶, Elena M. Yubero-Serrano ^{1,2,3,4} , Jose D. Torres-Peña ^{1,2,3,4}, Antonio P. Arenas-de Larriva ^{1,2,3,4} , Antonio Camargo ^{1,2,3,4} , Pablo Perez-Martinez ^{1,2,3,4} , Jose Lopez-Miranda ^{1,2,3,4,*}  and Javier Delgado-Lista ^{1,2,3,4,*} 

¹ Lipids and Atherosclerosis Unit, Department of Internal Medicine, Reina Sofia University Hospital, 14004 Córdoba, Spain

² Department of Medical and Surgical Sciences, University of Córdoba, 14004 Córdoba, Spain

³ Maimónides Biomedical Research Institute of Córdoba (IMIBIC), 14004 Córdoba, Spain

⁴ CIBER Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

⁵ Internal Medicine Unit, Jaen University Hospital, 23071 Jaen, Spain

⁶ Biochemical Laboratory, Reina Sofia University Hospital, 14004 Córdoba, Spain

* Correspondence: md1lomij@uco.es (J.L.-M.); md1delij@uco.es (J.D.-L.)

† These authors contributed equally to this work.

‡ Share joint seniorship.



Citation: Hidalgo-Moyano, C.; Rangel-Zuñiga, O.A.;

Gomez-Delgado, F.; Alcalá-Díaz, J.F.; Rodríguez-Cantalejo, F.;

Yubero-Serrano, E.M.; Torres-Peña,

J.D.; Arenas-de Larriva, A.P.;

Camargo, A.; Perez-Martinez, P.; et al.

Diet and *SIRT1* Genotype Interact to Modulate Aging-Related Processes in Patients with Coronary Heart

Disease: From the CORDIOPREV

Study. *Nutrients* **2022**, *14*, 3789.

[https://doi.org/10.3390/](https://doi.org/10.3390/nu14183789)

[nu14183789](https://doi.org/10.3390/nu14183789)

Academic Editor: Saroja Voruganti

Received: 11 August 2022

Accepted: 12 September 2022

Published: 14 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: We investigated whether long-term consumption of two healthy diets (low-fat (LF) or Mediterranean (Med)) interacts with *SIRT1* genotypes to modulate aging-related processes such as leucocyte telomere length (LTL), oxidative stress (OxS) and inflammation in patients with coronary heart disease (CHD). LTL, inflammation, OxS markers (at baseline and after 4 years of follow-up) and *SIRT1*-Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) (rs7069102 and rs1885472) were determined in patients from the CORDIOPREV study. We analyzed the genotype-marker interactions and the effect of diet on these interactions. Regardless of the diet, we observed LTL maintenance in GG-carriers for the rs7069102, in contrast to carriers of the minor C allele, where it decreased after follow-up ($p = 0.001$). The GG-carriers showed an increase in reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio ($p = 0.003$), lower lipid peroxidation products (LPO) levels ($p < 0.001$) and a greater decrease in tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels ($p < 0.001$) after follow-up. After the LF diet intervention, the GG-carriers showed stabilization in LTL which was significant compared to the C allele subjects ($p = 0.037$), although the protective effects found for inflammation and OxS markers remained significant after follow-up with the two diets. Patients who are homozygous for the *SIRT1*-SNP rs7069102 (the most common genotype) may benefit from healthy diets, as suggested by improvements in OxS and inflammation in patients with CHD, which may indicate the slowing-down of the aging process and its related diseases.

Keywords: genetic variants; healthy diets; coronary heart disease; role of sirtuins; aging-related processes

1. Introduction

According to the World Health Organization (WHO), there will be a significant increase over the next decade in the mortality rate from age-related chronic diseases (cardiovascular disease, diabetes, etc.) [1]. The WHO has stated that the majority of the population will have a life expectancy of 60 years or more and predicts that between 2015 and 2050, the percentage of the world's population aged 60 years old and over will almost double from 12% to 22% [2].

Many different factors are involved in cellular aging, such as an increase in oxidative stress (OxS) and inflammation, which impacts the functionality of molecules or structures related to aging, such as telomere length, among others. Previous results by our research group have demonstrated that a low intake of vitamin E accelerates cellular aging in patients with cardiovascular disease [3]. This suggests the need to focus studies on identifying patients at risk of unhealthy aging to take more effective and powerful steps aimed at delaying or slowing the aging process, and thus reducing the probability of developing aging-related diseases.

A healthy lifestyle, including a healthy diet, improves the maintenance of telomere length, inflammatory and OxS status, and adherence to an unhealthy lifestyle has the opposite effect [4]. Among the healthy diets that have been linked to an improvement in age-related changes are the Mediterranean (Med) diet [5–7] and low-fat (LF) dietary patterns [8–10].

There is a genetic component in aging and in age-related diseases [11,12] where single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been shown to be associated with processes related to the development of these diseases [13–15].

Sirtuins are a group of proteins involved in the protection and repair of DNA, as they participate in the deacetylation of histones, molecules that maintain the structure of the genetic sequence, and their dysfunction may be associated with cell damage, senescence or cellular aging [16]. They play a role in preventing OxS and inflammation [17] and are present in various intracellular locations in different tissues (liver, adipose tissue, endothelium, etc.). Their functionality is regulated by external factors such as diet [18,19], among others. For this reason, previous studies have focused on the regulation by sirtuins of the aging process and the development of age-related diseases [20,21]. The *SIRT1* gene encodes for the protein sirtuin 1 (Sirt1), which has a range of molecular functions and has emerged as an important protein in aging and metabolic regulation [22]. During the past decade, studies have suggested a correlation between Sirt1 activity and aging-associated diseases, including diabetes, cardiovascular disease and neurodegenerative disorders [23]. SNPs rs7069102 and rs1885472 are two SNPs in high LD located in the gene sequence. In a previous study with healthy people, the risk of developing cardiovascular disease was associated with the rs7069102 genotype, which points to the relationship between that polymorphism and cardiovascular disease [24]. However, to date, no research has looked into whether the biological effects of these SNPs are partly related to their association with age-related features.

Based on the above, we investigated whether long-term consumption of two healthy dietary patterns (LF diet or Med diet) interact with genetic variability at the *SIRT1* gene locus to modulate aging-related processes such as telomeres length, OxS and inflammation in patients with coronary heart disease (CHD).

2. Materials and Methods

2.1. Population

The current work was conducted within the framework of the CORDIOPREV study. The CORDIOPREV study was a prospective, randomized, controlled clinical trial. Dietary intervention was performed in patients with CHD whose inclusion period began in 2009. It included a total of 1002 patients between the ages of 20 and 75 years old, who took part in a dietary intervention with a Med or LF diet for a median of seven years. The details of the study design have been previously provided on [Clinicaltrials.gov](https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00924937) (NCT00924937) and the inclusion and exclusion criteria have been previously described [5]. Written consent was obtained from all the subjects before recruitment and the study protocol and all amendments were approved by the Ethics Committee of Hospital Reina Sofia, all of which follow the Helsinki Declaration and good clinical practices. We carried out our analysis in those subjects for whom we had complete information on the variables studied in the baseline situation and after 4 years of follow-up (clinical, biochemical, genetic and telomere length data ($n = 716$)).

2.2. Diet, Dietary Assessment and Follow-Up Visits

The patients were randomized into two different healthy dietary patterns: a Med diet rich in fat from olive oil, with >35% of calories from fat (22% monounsaturated (MUFA), 6% polyunsaturated (PUFA), <10% saturated (SFA)), 15% proteins and a maximum of 50% carbohydrates; and a LF diet, comprising <30% total fat (12–14% MUFA, 6–8% PUFA and <10% SFA), 15% protein, and a minimum of 55% carbohydrates. Briefing sessions were held for each type of diet and a regular follow-up was carried out by nutritionists, as detailed in previous publications of our group [25]. Dietary adherence in the CORDIOPREV study has previously been reported by Quintana-Navarro et al. [25]. Full study diets, dietary assessments, and follow-up visits have previously been reported [26].

2.3. Laboratory Measurements

Details of the measurements have been provided in a previous publication [27]. Blood samples were collected from the participants after a 12 h overnight fast at the beginning of the study and once a year during the follow-up period. In the present work, we used the information about biochemical parameters obtained at the beginning of the study and after 4 years of follow-up. Plasma and serum samples were collected in individual tubes and centrifuged, then immediately frozen at -80°C . The biochemical measurements were taken at the Reina Sofia University Hospital by staff who had no knowledge of the interventions. The main biochemical variables used in the present study were triglycerides, total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol (HDL-c), low density lipoprotein cholesterol (LDL-c), glucose and C-reactive protein (CRP). The methodologies used to carry out the measurements have been described previously [27].

2.4. OxS- and Inflammation-Related Parameters

As a sample of the total population of the study, oxidative-stress and inflammation-related data from 353 participants from the CORDIOPREV Study were acquired in the set of the PI13-00185 Grant (see acknowledgments), as previously published by our group [28]. Lipid peroxidation products (LPO), total glutathione, reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) and the GSH/GSSG ratio were determined, as previously defined [28]. GSH and GSSG content were measured in the plasma samples using the BIOXYTECH[®] GSH-400 Kit (OXIS International Inc., Portland, OR, USA) and the GSH-412 Kit (OXIS International Inc., Portland, OR, USA), respectively. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) was measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay ELISA kits (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.5. DNA Isolation from Blood Samples

DNA was obtained from the blood cells of the buffy coat fraction from blood contained in EDTA tubes. The DNA was isolated through the salting-out method, and the DNA was then resuspended in 500 μL of $1 \times \text{TE}$ buffer [29].

2.6. Genotyping

Genotyping was performed using the OpenArray[™] platform provided by Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA), using TaqMan assays C__1340389_10 (assay name: hCV1340389) for rs7069102 and C__11642237_10 (assay name: hCV11642237) for rs1885472 provided by Thermo Fisher Scientific Inc. (Database: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/snp-genotyping-taqman-assays.html>) (accessed on 13 September 2020). The procedure was carried out according to the manufacturer's instructions using an AccuFill[™] robot for array loading, a 9700 thermal cycler for polymerase chain reaction (PCR) and an NT cycler for fluorescence reading (all provided by Thermo Fisher Scientific Inc.). The Hardy–Weinberg equilibrium was measured using the gene calc bioinformatic tool [30]. TaqMan[™] Genotyper software V 1.3 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used for genotype calling. We used 1000 GENOMES phase_3:IBS (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) (ac-

cessed on 13 September 2020), as the reference population. The Pairwise LD level among *SIRT1* SNPs was validated by analyzing the D' and r^2 values using Ensembl (Human GRCh38.p13) in the same population group.

2.7. Quantitative PCR Analysis of Leucocyte Telomere Length (LTL)

We analyzed LTL at the beginning and after four years of follow-up, as per the study protocol. We used the Cawthon method with quantitative PCR [31], as in the previous papers from our group [27,32,33]. PCR reactions were carried out on an iQ5 thermal cycler using a SensiFAST™ SYBR Lo-ROX kit, where for all samples the ratio of telomere to constitutive gene RPL13a was estimated. The sequence of primers used and PCR conditions have previously been published [27].

2.8. Statistics

We used SPSS Statistics for Windows (version 28.0) (IBM, Chicago, IL, USA) and data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). The differences in mean biochemical and anthropometric parameters and the interaction with the genotype were evaluated by One-Way ANOVA analysis (Supplementary Table S1). The comparison of clinical and anthropometric parameters according to diet and genotype was carried out using One-Way ANOVA analysis, separately and independently for each diet, with the SNP rs7069102 genotype as a factor. Comparisons of frequencies between qualitative variables were carried out using the Chi-Square test. ANOVA for repeated measures was used to analyze the changes during the study. The Greenhouse-Geisser contrast statistic was used when the sphericity assumption was not satisfied. In this analysis, we studied the overall genotype influence (global ANOVA, p for genotype influence), the kinetics of the intervention (p for time), and the interaction of the two factors (genotype vs. time). When post hoc test analyses were pertinent, we used multiple comparison tests with the Sidak correction. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Baseline Characteristics according to the *SIRT1* SNPs Genotype

The genotype distributions of both SNPs did not deviate from the Hardy–Weinberg expectations. We compared the allelic frequencies observed for both *SIRT1* SNPs with the 1000 genomes database. The minor allele frequency for the SNP rs7069102 was C = 0.305 (1000 genomes: C = 0.355) and for the SNP rs1885472 was G = 0.317 (1000 genomes: G = 0.355). The genotypic frequencies observed for the SNP rs7069102 were G/G = 47.78%; G/C = 43.43%; C/C = 8.79%, and for the SNP rs1885472 were C/C = 47.02%; C/G = 42.45%; G/G = 10.53%. The LD analysis showed that the SNPs rs1885472 and rs7069102 were $D' = 1.000$ and $r^2 = 1.000$, suggesting that the loci are in complete LD and coinherited in most cases. Therefore, given its association, and the existence of previous literature with SNP rs7069102, but not with rs1885472, we decided to continue showing the analysis with rs7069102 in this article. Since our analyses did not support a recessive mode of action for this SNP and given the low frequencies of the genotype CC in rs7069102, we conducted our subsequent analyses using a dominant model for the minor allele.

The demographic, anthropometric and biochemical characteristics according to the *SIRT1* SNP rs7069102 and diet are presented in Table 1. At baseline, we observed a significant difference in weight in patients randomized to the Med diet who were also carriers of the C allele compared to carriers of the GG genotype ($p = 0.043$). No significant differences were observed in the other parameters analyzed, nor in the patients who followed the LF dietary pattern (Table 1). No significant differences according to genotype for baseline anthropometrics, cholesterol, glucose or CRP values were observed for the *SIRT1* SNP rs7069102 (Supplementary Table S1).

Table 1. Characteristics of patients according to genotype for *SIRT1* polymorphism rs7069102 and diet.

Parameters	LF Diet			Med Diet		
	GG	CG + CC	<i>p</i> Value	GG	CG + CC	<i>p</i> Value
N	162	171		189	194	
Men/Women (n)	134/28	145/26	0.607	164/25	151/43	0.022 *
Age (years)	58.7 ± 8.7	59.6 ± 8.1	0.329	59.3 ± 8.9	59.8 ± 9.2	0.629
Weight (kg)	85.3 ± 12.8	84.5 ± 12.2	0.547	86.6 ± 14.2	83.7 ± 14	0.043 *
Waist circumference (cm)	104.5 ± 10.4	105.1 ± 10.2	0.628	105.2 ± 11.5	104.1 ± 11	0.311
BMI (kg/m ²)	31.2 ± 4.3	30.7 ± 4	0.289	31.4 ± 4.4	30.9 ± 4.4	0.315
Total cholesterol (mg/dL)	157.2 ± 29.8	160.1 ± 28.2	0.359	158.5 ± 33.1	159.6 ± 31.5	0.723
HDL-C (mg/dL)	42.1 ± 10	42.9 ± 10.1	0.452	42.2 ± 10.3	42.1 ± 10.3	0.931
LDL-C (mg/dL)	86.8 ± 23.9	89.7 ± 23.5	0.281	88.2 ± 26.6	90.1 ± 25.4	0.486
TG (mg/dL)	128 ± 64.4	142.2 ± 73.4	0.063	137.1 ± 71	130.1 ± 64.5	0.315
Glucose (mg/dL)	108.8 ± 29.5	113.4 ± 38.3	0.219	115.4 ± 40.8	111.4 ± 36.3	0.316
CRP (mg/dL)	3.6 ± 4.3	2.8 ± 3.2	0.073	2.7 ± 3.7	2.8 ± 3.1	0.945

Values are expressed as mean ± SEM. LF, low fat; Med, Mediterranean; BMI, Body mass index; HDL-C, high-density lipoprotein; LDL-C, low-density lipoprotein; TG, triglycerides; CRP, C-reactive protein. Variables were calculated using One-Way ANOVA analysis. * *p* values < 0.05.

3.2. Relationship between the SNP rs7069102 and LTL

In the whole population, we observed a maintenance of LTL in patients carrying the GG genotype, in contrast to carriers of the mutant C allele, in whom LTL decreased after 4 years of follow-up compared with baseline (*p* = 0.001) (Figure 1).

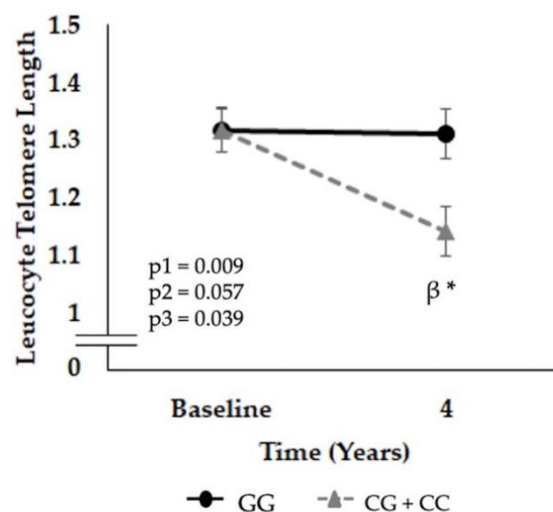


Figure 1. Leucocyte telomere length according to the single nucleotide polymorphism (SNP) rs7069102 genotype located on the *SIRT1* gene after the follow-up period. Data are represented as the mean ± SEM and correspond to ANOVA for repeated measures; where p1: time follow-up, p2: genotype influence and p3: the interaction of the two factors (time vs. genotype). When post hoc tests were pertinent, we used multiple comparisons with the Sidak correction. * *p* < 0.05 4 years vs. baseline, β *p* < 0.05 genotypes in the same time. The data correspond to the population included in the study where 351 subjects are carriers of the GG genotype (49%) and 365 of the CG + CC genotype (51%) (combined both LF and Med diets).

3.3. Relationship between the SNP rs7069102 and Inflammation and OxS-Related Parameters

Subjects with the GG genotype showed an increase in GSH/GSSG ratio values compared to their baseline levels (*p* = 0.003) (Figure 2A). Additionally, the LPO levels decreases in both genotypes (GG and CG + CC) (both *p* < 0.001), however it decreases more in GG carriers after the intervention period compared to baseline (Figure 2B). Moreover, a significant decrease in TNF- α levels was observed in both the GG and CG + CC genotypes (both

$p < 0.001$, respectively), although this profile was significantly greater in GG homozygotes after 4 years of follow-up ($p = 0.022$) (Figure 2C).

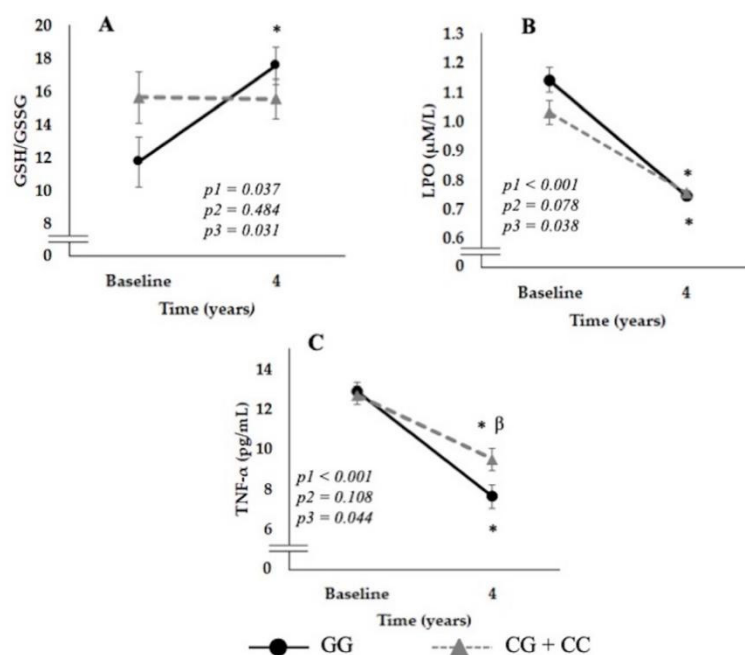


Figure 2. Changes in variables associated with oxidative stress (OxS) and inflammation according to SNP rs7069102 genotype located in *SIRT1* gene (Panel A, reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG); B, lipid peroxidation products (LPO); C, tumor necrosis factor-alpha TNF- α). Data are represented as the mean \pm SEM and correspond to ANOVA for repeated measures; where p1: time of follow-up, p2: genotype influence and p3: the interaction of the two factors (time vs. genotype). When post hoc tests were pertinent, we used multiple comparisons with the Sidak correction. * $p < 0.05$ 4 years vs. baseline, β $p < 0.05$ genotypes in the same time. The data correspond to the population included in the study selected to the OxS and inflammation analyses where the where 49% carried the GG genotype and 51% carried the C allele.

3.4. Effect of Diet on LTL and Inflammation-Related Parameters According to *SIRT1* Gene Variants

3.4.1. Patients Randomized to the LF Diet

For the SNP rs7069102, after dietary intervention with the LF diet, a stabilization in LTL was observed in subjects with the GG genotype, which decreased significantly in subjects carrying the CG + CC genotypes ($p = 0.012$) (Figure 3B).

TNF- α levels decreased after 4 years in subjects carrying both genotypes (GG $p < 0.001$ and CG + CC $p = 0.020$). However, this decrease was significantly greater in subjects carrying the GG genotype ($p = 0.007$) (Figure 3D). These GG patients also showed a significant decrease in CRP levels when compared with carriers of the C allele (p time vs. genotype = 0.025) (Figure 3F).

3.4.2. Patients Randomized to Med Diet

Telomere length decreased in GG and GC+CC patients after 4 years of follow-up. No significant differences were observed between GG and GC+CC patients in terms of TNF- α levels and CRP levels (Figure 3A,C,E).

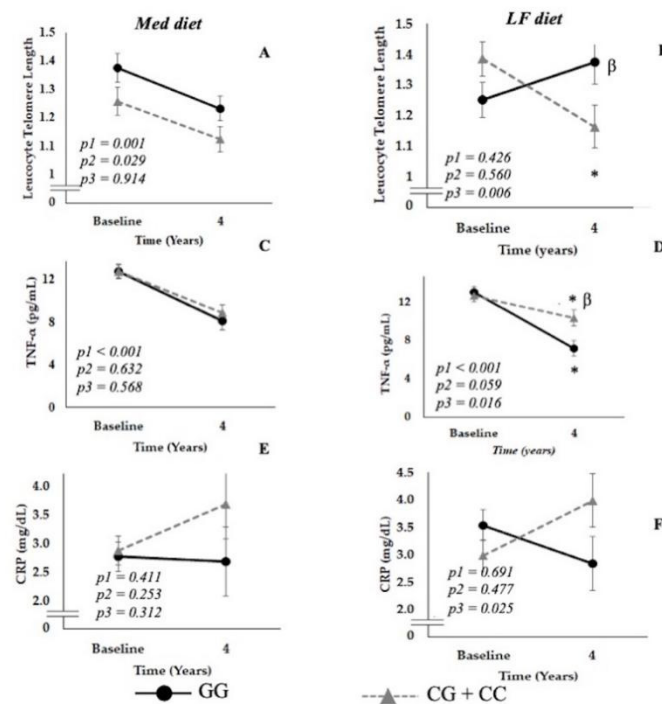


Figure 3. Interaction between diet and aging- and inflammation-related parameters according to SNP rs7069102 genotype located in *SIRT1* gene (Panels A,C,E, Mediterranean Diet and Leukocyte Telomere Length, TNF- α and CRP; Panels B,D,F, Low-Fat Diet and Leucocyte Telomere Length, TNF- α and CRP). Data are represented as the mean \pm SEM and correspond to an ANOVA for repeated measures, where p1: time of follow-up, p2: genotype influence and p3: the interaction of the two factors (time vs. genotype). When post hoc tests were pertinent, we used multiple comparisons with the Sidak correction. * $p < 0.05$ 4 years vs. baseline, β $p < 0.05$ genotypes in the same time period.

4. Discussion

Our results demonstrate the interaction between diet and rs7069102 gene variation of the *SIRT1* gene in the modulation of aging-associated markers. We observed that subjects homozygous for the common allele who followed a LF dietary pattern for 4 years showed, over time, benefits in telomere length evolution, which is a marker of cellular aging. Additionally, in these patients, we also observed a decrease in TNF- α and CRP, which are markers of OxS and inflammation and factors previously associated with telomere length. In parallel, and as an internal control study, we performed the same data analysis with the high LD association rs1885472 that replicated all the findings for rs7069102.

The WHO estimates that deaths from chronic diseases associated with aging will double in the next 10 years. This is because the percentage of the world's population aged 60 years old and over will increase almost two-fold from 12% to 22% [2]. The development of diseases associated with aging is directly related to cellular senescence, where cells are unable to carry out certain biological processes. In various metabolic diseases such as diabetes mellitus and cardiovascular diseases, the adoption of healthy eating habits has been proven to be useful to slow down the aging process and cellular dysfunction. Previous studies have demonstrated the beneficial effect of adherence to diets such as the Med diet or LF diet on markers associated with aging [10,32]. However, nutritional habits may have a different effect on the aging process, partly due to the genetic diversity of the population. In fact, during the aging process, these genetic characteristics also determine changes at the cellular level such as apoptosis, telomeric shortening and mitochondrial activity [32,34,35]. This directly impacts on markers associated with OxS (GSH and GSSG, LPO), inflammation (TNF- α and CRP) and telomere length.

In this context, the proteins known as sirtuins, due to their involvement in apoptosis, inflammation and mitochondrial activity, are related to the protection against arterial calci-

fication, the regulation of mitochondrial function and the antioxidant defense system [36]. Although the rs7069102 genotype was previously associated with an increase in the risk of developing cardiovascular disease in healthy subjects [24], it was not previously associated with changes in cellular age-related features, such as telomere length. Regarding the other SNP chosen for investigation, rs1885472, there is little previous evidence available about its relationship with aging, disease and how environmental factors such as diet affect it, but its high LD with rs7069102 enabled us to confirm the data obtained. Due to the high co-inheritability, we only showed the results for rs7069102, selecting it as an SNP tag. However, we also performed all the analyses with rs1885472 (data not shown), which replicated the results obtained for rs7069102. The consistency of these results with rs1885472 provides an internal control which helps to corroborate the main body of evidence.

In our study, when we analyzed the whole population, not splitting the sample by diet type, subjects carrying the mutated alleles showed a decrease, after 4 years, in telomere length, in contrast to the maintenance in the telomere length found in the homozygotes for the common allele. Although concomitant improvements in OxS (LPO) and inflammation parameters (TNF- α) were found in all participants, these changes were more favorable in the common allele homozygotes.

One interesting finding of our study was that telomere length did not differ at the beginning of the study between C-carriers and GG patients. We believe that this is a clear case of Nutrigenomics, rather than a genetic effect, as we were not able to see differences in the telomeres in subjects who were not distributed to different dietary patterns, and that it was precisely the dietary intervention that allowed us to find this association between nutrition and genotype. In this context, in relation to diet, a previous study analyzed the association between *SIRT1* SNPs (rs7069102, rs2273773, rs3818292), suggesting that the combination of genetic variants of the *SIRT1* gene and dietary n-6 and/or n-3 PUFA intake influences the serum levels of LDL-C and HDL-C [37]. In our study, we observed that carriers of the mutated alleles at SNPs rs7069102 (and rs1885472), after a 4-year follow-up of a LF diet, showed some changes in parameters associated with ageing (telomere length) and inflammation, which were not found in carriers of the ancestral alleles.

As mentioned above, when we analyzed the data from the whole population (without splitting the population into dietary arms), we saw beneficial differences in variables related to aging in the subjects homozygous for the common allele. This could be interpreted as a favorable association following the intervention with either diet. Specific evaluation of the results by diet showed that these effects were only statistically evident in the subgroup of the LF diet, which may indicate that the LF diet performed better, or that we were not able to identify those specific beneficial effects in the Med diet group due to a lack of statistical power for the results obtained. Nevertheless, to provide an explanation underlying our results, we should remember that, although the Med Diet and the LF diet show some common features, there are differences, such as the fat content, that could act as drivers of the associations found.

Our study has certain limitations. It was conducted in a population with CHD, which suggests that our results should not be extrapolated to the general population. Additionally, in our study, we analyzed telomere length over a certain time period, which does not allow us to infer either the total length of the telomere or the changes that this length had in the years before of the study started, when the subjects were on an ad libitum diet. Finally, larger-scale studies would be needed to replicate our findings.

5. Conclusions

In conclusion, the genetic variants located in the *SIRT1* gene will enable us to offer our patients a personalized diet tailored to their genetic characteristics, which allows us to slow down the aging process and its related diseases by improving the OxS and inflammation-related parameters. In our case, homozygotes for the rs7069102 SNP would benefit from a LF diet to slow telomere shortening.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu14183789/s1>, Table S1. Characteristics of patients included in the study according to the genotype for the *SIRT1* polymorphism rs7069102.

Author Contributions: Conceptualization, C.H.-M., O.A.R.-Z. and J.D.-L.; Methodology, O.A.R.-Z., F.R.-C., E.M.Y.-S., J.D.T.-P. and A.C.; Validation, O.A.R.-Z., J.F.A.-D., P.P.-M. and J.D.-L.; formal analysis, C.H.-M., O.A.R.-Z., F.G.-D., J.F.A.-D. and J.D.-L.; resources, P.P.-M., J.L.-M. and J.D.-L.; data curation, O.A.R.-Z., J.F.A.-D., A.P.A.-d.L. and J.D.-L.; writing—original draft preparation, O.A.R.-Z., C.H.-M. and J.D.-L.; writing—review and editing, J.L.-M. and J.D.-L.; supervision, J.L.-M. and J.D.-L.; project administration, P.P.-M., J.L.-M. and J.D.-L.; funding acquisition, P.P.-M. and J.L.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The Cordioprev Study was funded by Fundación Patrimonio Comunal Olivarero, Junta de Andalucía (Consejería de Salud, Consejería de Agricultura y Pesca, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa), Diputaciones de Jaén y Córdoba, Centro de Excelencia en Investigación sobre Aceite de Oliva y Salud and Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, Gobierno de España; Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2012/39615, PIE14/00005, and PIE 14/00031 to J.L.-M.; AGL2015-67896-P to J.L.-M. and A.C.); Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Proyectos de Investigación de Excelencia, Junta de Andalucía (CVI-7450 to J.L.-M.); and by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), JPI HDHL-NutriCog (PCIN-2016-084 to J.L.-M.). Instituto de Salud Carlos III, acción estratégica en salud 2013 to P.P.-M. (FIS-PI13/00185). The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. Juan Francisco Alcalá-Díaz is supported by a Servicio Andaluz de Salud research contract (Acción B-Clinicos investigadores RB-0002-2022). Antonio Pablo Arenas-de Larriva is supported by an ISCIII research contract (Programa Río Ortega CM20/00242). Oriol Alberto Rangel Zúñiga and Antonio Camargo are supported by an ISCIII research contract (Programa Miguel-Servet CP19/00142 and CP14/00114, respectively).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Helsinki Declaration and approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario Reina Sofía of Córdoba. The study is registered in [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (NCT00924937).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects included in the CORDIOPREV study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the repositories of the Maimónides Biomedical Research Institute of Córdoba (IMIBIC), upon request to the corresponding authors and to the principal investigators of the project P.P.-M., J.D.-L. and J.L.-M.

Acknowledgments: We would like to express our gratitude to all the subjects who participated in the study, and the Córdoba branch of the Biobank of the Andalusian Public Health Service (Andalusia, Spain) for providing the human biological samples. We would also like to thank the EASP (Andalusian School of Public Health), Granada, Spain, which performed the randomization process for this study. Thanks also go to Jose Andres Morales Martinez and Rosario Carreras for providing technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ebeling, M.; Rau, R.; Malmstrom, H.; Ahlbom, A.; Modig, K. The rate by which mortality increases with age is the same for those who experienced chronic disease as for the general population. *Age Ageing* **2021**, *50*, 1633–1640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. World Health Organization. Ageing and Health. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health> (accessed on 25 May 2022).
3. Corina, A.; Rangel-Zuniga, O.A.; Jimenez-Lucena, R.; Alcalá-Díaz, J.F.; Quintana-Navarro, G.; Yubero-Serrano, E.M.; Lopez-Moreno, J.; Delgado-Lista, J.; Tinahones, F.; Ordovas, J.M.; et al. Low Intake of Vitamin E Accelerates Cellular Aging in Patients With Established Cardiovascular Disease: The CORDIOPREV Study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2019**, *74*, 770–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Demissie, S.; Levy, D.; Benjamin, E.J.; Cupples, L.A.; Gardner, J.P.; Herbert, A.; Kimura, M.; Larson, M.G.; Meigs, J.B.; Keaney, J.F.; et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* **2006**, *5*, 325–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Delgado-Lista, J.; Alcalá-Díaz, J.F.; Torres-Pena, J.D.; Quintana-Navarro, G.M.; Fuentes, F.; García-Ríos, A.; Ortiz-Morales, A.M.; González-Requero, A.I.; Pérez-Caballero, A.I.; Yubero-Serrano, E.M.; et al. Long-term secondary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet and a low-fat diet (CORDIOPREV): A randomised controlled trial. *Lancet* **2022**, *399*, 1876–1885. [[CrossRef](#)]
6. Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvado, J.; Covas, M.I.; Corella, D.; Aros, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, e34. [[CrossRef](#)]
7. Galie, S.; Canudas, S.; Muralidharan, J.; García-Gavilan, J.; Bullo, M.; Salas-Salvado, J. Impact of Nutrition on Telomere Health: Systematic Review of Observational Cohort Studies and Randomized Clinical Trials. *Adv. Nutr.* **2020**, *11*, 576–601. [[CrossRef](#)]
8. Dolinsky, V.W.; Dyck, J.R. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1812*, 1477–1489. [[CrossRef](#)]
9. Eyre, H.; Kahn, R.; Robertson, R.M.; Clark, N.G.; Doyle, C.; Hong, Y.; Gansler, T.; Glynn, T.; Smith, R.A.; Taubert, K.; et al. Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes: A common agenda for the American Cancer Society, the American Diabetes Association, and the American Heart Association. *Circulation* **2004**, *109*, 3244–3255. [[CrossRef](#)]
10. Weiss, E.P.; Fontana, L. Caloric restriction: Powerful protection for the aging heart and vasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2011**, *301*, H1205–H1219. [[CrossRef](#)]
11. Johnson, S.C.; Dong, X.; Vijg, J.; Suh, Y. Genetic evidence for common pathways in human age-related diseases. *Aging Cell* **2015**, *14*, 809–817. [[CrossRef](#)]
12. Richardson, A.G.; Schadt, E.E. The role of macromolecular damage in aging and age-related disease. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2014**, *69* (Suppl. 1), S28–S32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Angelakopoulou, A.; Shah, T.; Sofat, R.; Shah, S.; Berry, D.J.; Cooper, J.; Palmen, J.; Tzoulaki, I.; Wong, A.; Jefferis, B.J.; et al. Comparative analysis of genome-wide association studies signals for lipids, diabetes, and coronary heart disease: Cardiovascular Biomarker Genetics Collaboration. *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 393–407. [[CrossRef](#)]
14. Corsetti, J.P.; Gansevoort, R.T.; Navis, G.; Sparks, C.E.; Dullaart, R.P. LPL polymorphism (D9N) predicts cardiovascular disease risk directly and through interaction with CETP polymorphism (TaqIB) in women with high HDL cholesterol and CRP. *Atherosclerosis* **2011**, *214*, 373–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Vasto, S.; Candore, G.; Duro, G.; Lio, D.; Grimaldi, M.P.; Caruso, C. Alzheimer’s disease and genetics of inflammation: A pharmacogenomic vision. *Pharmacogenomics* **2007**, *8*, 1735–1745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Li, X.; Liu, L.; Li, T.; Liu, M.; Wang, Y.; Ma, H.; Mu, N.; Wang, H. SIRT6 in Senescence and Aging-Related Cardiovascular Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 641315. [[CrossRef](#)]
17. Singh, V.; Ubaid, S. Role of Silent Information Regulator 1 (SIRT1) in Regulating Oxidative Stress and Inflammation. *Inflammation* **2020**, *43*, 1589–1598. [[CrossRef](#)]
18. Chalkiadaki, A.; Guarente, L. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell Metab.* **2012**, *16*, 180–188. [[CrossRef](#)]
19. Russo, M.A.; Sansone, L.; Polletta, L.; Runci, A.; Rashid, M.M.; De Santis, E.; Vernucci, E.; Carnevale, I.; Tafani, M. Sirtuins and resveratrol-derived compounds: A model for understanding the beneficial effects of the Mediterranean diet. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2014**, *14*, 300–308. [[CrossRef](#)]
20. Chang, H.C.; Guarente, L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **2014**, *25*, 138–145. [[CrossRef](#)]
21. Wenzel, U. Nutrition, sirtuins and aging. *Genes Nutr.* **2006**, *1*, 85–93. [[CrossRef](#)]
22. Yamamoto, H.; Schoonjans, K.; Auwerx, J. Sirtuin functions in health and disease. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 1745–1755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gong, H.; Pang, J.; Han, Y.; Dai, Y.; Dai, D.; Cai, J.; Zhang, T.M. Age-dependent tissue expression patterns of Sirt1 in senescence-accelerated mice. *Mol. Med. Rep.* **2014**, *10*, 3296–3302. [[CrossRef](#)]
24. Kilic, U.; Gok, O.; Bacaksiz, A.; Izmirli, M.; Elibol-Can, B.; Uysal, O. SIRT1 gene polymorphisms affect the protein expression in cardiovascular diseases. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90428. [[CrossRef](#)]
25. Quintana-Navarro, G.M.; Alcalá-Díaz, J.F.; López-Moreno, J.; Pérez-Corral, I.; Leon-Acuna, A.; Torres-Pena, J.D.; Rangel-Zuniga, O.A.; Arenas de Larriva, A.P.; Corina, A.; Camargo, A.; et al. Long-term dietary adherence and changes in dietary intake in coronary patients after intervention with a Mediterranean diet or a low-fat diet: The CORDIOPREV randomized trial. *Eur. J. Nutr.* **2020**, *59*, 2099–2110. [[CrossRef](#)]
26. Delgado-Lista, J.; Pérez-Martínez, P.; García-Ríos, A.; Alcalá-Díaz, J.F.; Pérez-Caballero, A.I.; Gómez-Delgado, F.; Fuentes, F.; Quintana-Navarro, G.; López-Segura, F.; Ortiz-Morales, A.M.; et al. CORonary Diet Intervention with Olive oil and cardiovascular PREvention study (the CORDIOPREV study): Rationale, methods, and baseline characteristics: A clinical trial comparing the efficacy of a Mediterranean diet rich in olive oil versus a low-fat diet on cardiovascular disease in coronary patients. *Am. Heart J.* **2016**, *177*, 42–50. [[CrossRef](#)]
27. Rangel-Zuniga, O.A.; Corina, A.; Lucena-Porras, B.; Cruz-Teno, C.; Gómez-Delgado, F.; Jiménez-Lucena, R.; Alcalá-Díaz, J.F.; Haro-Mariscal, C.; Yubero-Serrano, E.M.; Delgado-Lista, J.; et al. TNFA gene variants related to the inflammatory status and its association with cellular aging: From the CORDIOPREV study. *Exp. Gerontol.* **2016**, *83*, 56–62. [[CrossRef](#)]

28. Ortiz-Morales, A.M.; Alcala-Diaz, J.F.; Rangel-Zuniga, O.A.; Corina, A.; Quintana-Navarro, G.; Cardelo, M.P.; Yubero-Serrano, E.; Malagon, M.M.; Delgado-Lista, J.; Ordovas, J.M.; et al. Biological senescence risk score. A practical tool to predict biological senescence status. *Eur. J. Clin. Investig.* **2020**, *50*, e13305. [[CrossRef](#)]
29. Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 1215. [[CrossRef](#)]
30. Bińkowski, J.; Miks, S. Gene-Calc [Computer Software]. September 2018. Available online: www.gene-calc.pl (accessed on 11 September 2022).
31. Cawthon, R.M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e47. [[CrossRef](#)]
32. Gomez-Delgado, F.; Delgado-Lista, J.; Lopez-Moreno, J.; Rangel-Zuniga, O.A.; Alcala-Diaz, J.F.; Leon-Acuna, A.; Corina, A.; Yubero-Serrano, E.; Torres-Pena, J.D.; Camargo, A.; et al. Telomerase RNA Component Genetic Variants Interact With the Mediterranean Diet Modifying the Inflammatory Status and its Relationship with Aging: CORDIOPREV Study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2018**, *73*, 327–332. [[CrossRef](#)]
33. Gonzalez-Guardia, L.; Yubero-Serrano, E.M.; Rangel-Zuniga, O.; Marin, C.; Camargo, A.; Perez-Martinez, P.; Delgado-Lista, J.; Gomez-Delgado, F.; Garcia-Rios, A.; Tinahones, F.J.; et al. Influence of endothelial dysfunction on telomere length in subjects with metabolic syndrome: LIPGENE study. *Age* **2014**, *36*, 9681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Passos, J.F.; Saretzki, G.; von Zglinicki, T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: Is there a connection? *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7505–7513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Salpea, K.D.; Talmud, P.J.; Cooper, J.A.; Maubaret, C.G.; Stephens, J.W.; Abelak, K.; Humphries, S.E. Association of telomere length with type 2 diabetes, oxidative stress and UCP2 gene variation. *Atherosclerosis* **2010**, *209*, 42–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Fujimoto, N.; Hastings, J.L.; Bhella, P.S.; Shibata, S.; Gandhi, N.K.; Carrick-Ranson, G.; Palmer, D.; Levine, B.D. Effect of ageing on left ventricular compliance and distensibility in healthy sedentary humans. *J. Physiol.* **2012**, *590*, 1871–1880. [[CrossRef](#)]
37. Inamori, T.; Goda, T.; Kasezawa, N.; Yamakawa-Kobayashi, K. The combined effects of genetic variation in the SIRT1 gene and dietary intake of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on serum LDL-C and HDL-C levels: A population-based study. *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*, 4. [[CrossRef](#)]