



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Factores predictores de senescencia biológica en
pacientes con alto riesgo cardiovascular:
Estudio CORDIOPREV**

**Predictive factors of biological senescence in patients
with high cardiovascular risk:
The CORDIOPREV study**

Autor: Ana María Ortiz Morales

Directores: Pablo Pérez Martínez
José López Miranda

Programa de Doctorado en Biomedicina
Línea de Nutrigenómica: Interacción genes-ambiente



9 de diciembre de 2020

Córdoba, España

TITULO: *Factores predictores de senescencia biológica en pacientes con alto riesgo cardiovascular: Estudio CORDIOPREV*

AUTOR: *Ana María Ortiz Morales*

© Edita: UCOPress. 2021
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

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



TÍTULO DE LA TESIS:

FACTORES PREDICTORES DE SENESCENCIA BIOLÓGICA EN PACIENTES CON ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR: ESTUDIO CORDIOPREV

DOCTORANDA: ANA MARÍA ORTIZ MORALES

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTORES/ES DE LA TESIS

D. PABLO PÉREZ MARTÍNEZ, CATEDRÁTICO DE MEDICINA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA Y D. JOSÉ LÓPEZ MIRANDA, CATEDRÁTICO DE MEDICINA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado "FACTORES PREDICTORES DE SENESCENCIA BIOLÓGICA EN PACIENTES CON ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR: ESTUDIO CORDIOPREV" ha sido realizado por D^a ANA MARÍA ORTIZ MORALES, bajo nuestra dirección, en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), dentro del grupo CG9: Nutrigenómica. Síndrome Metabólico.

Este trabajo ha conseguido un nivel científico de suficiente relevancia como para derivar en la publicación de un artículo en revista internacional, incluidas dentro de Q1 de su categoría y la colaboración en la generación de una patente:

- Biological senescence risk score. A practical tool to predict biological senescence status. Ortiz-Morales AM. et al. Eur J Clin Invest. 2020 Nov;50(11):e13305. doi:10.1111/eci.13305). Factor de impacto: 3,481.
- Título patente: NUTRICLOCK. Inventores/Autores: Ana María Ortiz Morales et al. Entidad Titular de derecho: Servicio Andaluz de Salud; Universidad de Córdoba; CIBEROBN. Código: RPI201799901594741. Año 2017.

A nuestro juicio, reúne los méritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba. Por todo ello, se autoriza la presentación la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 9 de diciembre de 2020
Firma de los directores

PEREZ MARTINEZ
PABLO -
30801943K

Firmado digitalmente por
PEREZ MARTINEZ PABLO -
30801943K
Fecha: 2020.12.04 07:56:52
+01'00'

Fdo.: Prof. Dr. Pablo Pérez Martínez

LOPEZ MIRANDA
JOSE - 30477760T

Firmado digitalmente por LOPEZ
MIRANDA JOSE - 30477760T
Fecha: 2020.12.04 11:40:44
+01'00'

Fdo.: Prof. Dr. José López Miranda

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Echando la vista atrás y viéndome ahora al final del camino, me emociono al pensar en todas aquellas personas e instituciones que de alguna manera han facilitado mi andadura. Por ello, quiero expresar en estas líneas mi más sincero agradecimiento hacia ellas.

En primer lugar, agradecer a mis directores el Prof. Dr. Pablo Pérez Martínez y el Prof. Dr. José López Miranda haber confiado en mí y decidir guiarme en la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Prof. Dr. José López Miranda, por su ejemplo como médico y científico, por su continuo trabajo, esfuerzo y perseverancia en cualquier proyecto que lidera, transmitiéndonos a todos su ilusión por la investigación y demostrándonos que con esfuerzo siempre obtenemos la recompensa merecida.

Agradecimiento muy especial al Prof. Dr. Pablo Pérez Martínez, mi mentor, representando un referente para mí por su destacada calidad científica y humana, por su profesionalidad, disponibilidad y apoyo incondicional, guiándome en el arduo camino de la investigación y permitiendo dar forma a esta tesis.

Al Prof. Dr. Francisco Pérez Jiménez, como referente para nuestro grupo, por su excelencia académica y médica, inculcándonos la necesidad de incorporar la investigación para alcanzar la plenitud en nuestra carrera profesional.

Al Dr. Juan Francisco Alcalá Díaz por su inestimable ayuda en el desarrollo de este trabajo, por sus conocimientos, consejos, cariño y disponibilidad. Juntos hemos conseguido avanzar en este camino.

Al Prof. Dr. Javier Delgado Lista por su trabajo diario y apoyo, facilitándonos nuestra labor médica e investigadora en el día a día.

A todos los integrantes de nuestra Unidad de Lípidos, especialmente a Francisco Fuentes Jiménez, Antonio García Ríos, Nieves Delgado Casado, Francisco Gómez Delgado, Ana León Acuña, José David Torres Peña, Antonio P. Arenas de Larriva y

Gracia Quintana-Navarro, por el cariño, esfuerzo y apoyo que han demostrado en todos estos años compartidos.

A todos los pacientes que se han prestado voluntariamente a la realización de este proyecto; ellos son la razón y el fin de todo nuestro esfuerzo.

A mis padres, José María y Petronila, por su amor infinito, enseñanzas, esfuerzo y dedicación, transmitiéndome los valores necesarios para llevarme a ser la persona que soy. A mis hermanas, Inmaculada y María José, por acompañarme a lo largo de nuestra vida, estar siempre juntas, apoyándonos en los momentos felices y en los momentos difíciles; es un orgullo para mi teneros como familia y amigas. A mis suegros, Rafa y Toñi, por su cariño y ayuda en nuestro día a día.

A Rafa, mi marido, por unir un día nuestros caminos y decidir formar una familia, por su amor incondicional, generosidad, apoyo y comprensión, ayudándome a cumplir este sueño. A nuestras hijas, Claudia y María, por llenar nuestras vidas de alegría y felicidad.

Los resultados de esta tesis doctoral han sido financiados con fondos derivados del Proyecto PI13 / 00185 del Instituto de Salud Carlos III.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	13
II. INTRODUCCIÓN.....	23
1. ENVEJECIMIENTO	23
1.1 <i>El envejecimiento como proceso natural</i>	23
1.2 <i>El envejecimiento biológico y la patología cardiovascular</i>	24
1.3 <i>Los mecanismos del envejecimiento</i>	26
2. <i>RELEVANCIA CLÍNICA DEL ACORTAMIENTO DE LOS TELÓMEROS</i>	29
3. <i>FACTORES GENÉTICOS Y ENVEJECIMIENTO</i>	32
4. <i>ENVEJECIMIENTO Y ESTADO PROINFLAMATORIO CRÓNICO</i>	35
5. <i>ENVEJECIMIENTO Y ESTRÉS OXIDATIVO</i>	39
6. <i>RIESGO CARDIOVASCULAR Y ENVEJECIMIENTO</i>	42
7. <i>MEDICINA DE PRECISIÓN</i>	44
III. HIPÓTESIS	49
IV. OBJETIVOS	53
1. <i>OBJETIVO PRINCIPAL</i>	53
2. <i>OBJETIVO SECUNDARIO</i>	53
V. POBLACIÓN, DISEÑO Y METODOLOGÍA	57
1. <i>DISEÑO DEL ESTUDIO</i>	57
2. <i>POBLACIÓN DEL ESTUDIO</i>	57
3. <i>EVALUACIÓN DE VARIABLES GENERALES</i>	61
4. <i>EVALUACIÓN ANTROPOMÉTRICAS</i>	62
5. <i>DETERMINACIONES ANALÍTICAS</i>	62
5.1 <i>Determinación de biomarcadores inflamatorios</i>	63
5.2 <i>Determinación de biomarcadores oxidativos</i>	63

6. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA LONGITUD RELATIVA DE LOS TELÓMEROS POR PCR	64
7. ANÁLISIS GENÉTICO.....	65
7.1 Aislamiento del DNA.....	65
7.2 Genotipado de los polimorfismos	65
7.2.1 Genotipado de los polimorfismos rs2764264, rs13217795, rs2802292 localizados en el gen FOXO3	67
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	67
9. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	69
VI. RESULTADOS	73
1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES PERTENECIENTES AL ESTUDIO CORDIOPREV.....	73
2. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN NUESTRO SUBESTUDIO	73
3. FACTORES PREDICTORES DE RIESGO BIOLÓGICO DE SENESCENCIA	76
4. VALIDACIÓN INTERNA	77
5.- EFECTO DEL SNP DEL GEN FOXO3 COMO PREDICTOR DEL RIESGO DE SENESCENCIA BIOLÓGICA	78
VII. DISCUSIÓN	85
VIII. CONCLUSIONES	101
IX. ABREVIATURAS.....	105
X. BIBLIOGRAFÍA	111
XI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS	139

I. RESUMEN

ANTECEDENTES: El envejecimiento es un proceso fisiológico complejo que se produce a nivel celular, molecular y genético, y que se asocia a diversas patologías, entre las que destaca la enfermedad cardiovascular. Evidencias recientes sugieren que el acortamiento telomérico se considera un marcador independiente del aumento del riesgo de enfermedad coronaria. Una mejor comprensión de los mecanismos que subyacen a la senescencia biológica, destacando la inflamación crónica y el estrés oxidativo, puede permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que nos faciliten el manejo de las patologías asociadas al envejecimiento.

Nuestra **hipótesis** pretende demostrar si el desarrollo de una herramienta de e-Health permite evaluar el grado de senescencia en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida basados en aspectos clínicos, biológicos y genéticos del paciente.

OBJETIVOS: Nuestro objetivo principal es desarrollar una plataforma de e-Health que permita evaluar el grado de envejecimiento biológico en base al perfil clínico y biológico del paciente.

Para desarrollar dicha plataforma analizaremos el patrón de senescencia biológica medido por la longitud de los telómeros, junto a parámetros de respuesta inflamatoria, marcadores de estrés oxidativo y marcadores genéticos en una población con enfermedad cardiovascular establecida de la cohorte del estudio CORDIOPREV (NCT00924937).

POBLACIÓN, DISEÑO Y METODOLOGÍA: El estudio CORDIOPREV es un ensayo clínico, aleatorizado, simple ciego de 1002 pacientes con patología coronaria. Se determinó la longitud telomérica relativa (RTL) al inicio del estudio, así como los siguientes marcadores de respuesta inflamatoria (PCR-us, proteína quimiotáctica de monocitos-1, IL-6, IL-1 β , TNF- α , adiponectina, resistina y leptina), estrés oxidativo (óxido nítrico, productos de peroxidación de lípidos, proteínas carboniladas, catalasa,

glutación total, glutatión reducido, glutatión oxidado, superóxido dismutasa y glutatión peroxidado) y los polimorfismos localizados en el gen FOXO3 (*rs2764264* y *rs2802292*).

La senescencia biológica se definió como el valor igual o inferior al quintil más bajo de la RTL en nuestra población (RTL = 0,7629). Calculamos y validamos diferentes modelos predictivos mediante regresión logística, definidos cada uno de ellos por un conjunto de variables clínicas, marcadores de respuesta inflamatoria y de estrés oxidativo (modelo basal, modelo extendido y modelo reducido), permitiéndonos identificar los pacientes con senescencia biológica. Finalmente, completamos nuestro análisis con un último modelo en el que incluimos ciertas variantes genéticas del gen FOXO3.

RESULTADOS: Se seleccionaron aquellos pacientes con todas las variables propuestas para desarrollar los diferentes modelos predictivos (n = 353). Tras comparar ambos grupos (senescencia biológica versus no senescencia biológica) se identificaron diferencias significativas para los siguientes parámetros: colesterol total, catalasa, superóxido dismutasa, IL-1 β , resistina y leptina. Se calculó mediante regresión logística los coeficientes beta de las variables que pueden predecir el riesgo de senescencia biológica, definiendo en cada modelo como variable dependiente la senescencia biológica y como covariables diferentes biomarcadores según el modelo. En el modelo basal se incluyeron edad, género, índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, frecuencia cardiaca, colesterol HDL, triglicéridos en ayunas, PCR-us y HOMA-IR; en el modelo extendido se incluyeron los parámetros del modelo basal junto a glutatión total, glutatión reducido, glutatión oxidado, glutatión peroxidado, catalasa, superóxido dismutasa, proteínas carboniladas, oxido nítrico, productos de peroxidación lipídica, proteína quimiotáctica de monocitos-1, TNF- α , adiponectina, IL-1 β , IL6, resistina y leptina; en el modelo reducido se incluyeron los parámetros del modelo basal junto a catalasa, superóxido dismutasa, productos de peroxidación de lípidos, IL-1 β y resistina. A continuación, trazamos las curvas ROC y

utilizamos área bajo la curva para evaluar la capacidad de predicción de cada modelo, seleccionando el modelo extendido y el modelo reducido como los mas eficaces, siendo el área bajo de la curva de ROC en dichos modelos de 0,75 y 0,72 respectivamente. Finalmente, completamos nuestro análisis incluyendo al modelo reducido la información aportada por los polimorfismos del gen FOXO3, denominándolo modelo genético. Tras el cálculo del modelo trazamos la curva ROC y el área bajo la curva (AUC ROC = 0,74), proporcionando una discreta mejoría en la capacidad de predicción.

CONCLUSIONES: Nuestro estudio ha identificado diferentes modelos predictivos que nos permiten calcular el grado de senescencia biológica en pacientes coronarios, pudiendo de esta forma identificar un subgrupo de pacientes con mayor riesgo y que pueden requerir un manejo más exhaustivo y un tratamiento más intensivo.

SUMMARY

BACKGROUND: Aging is a complex physiological process that occurs at the cellular, molecular and genetic levels, and is associated with various pathologies, among which cardiovascular disease stands out. Recent evidence suggests that telomere shortening is considered an independent marker of increased risk of coronary heart disease. A better understanding of the mechanisms underlying biological senescence, highlighting chronic inflammation and oxidative stress, may allow the development of new therapeutic strategies that facilitate the management of pathologies associated with aging.

Our **hypothesis** aims to demonstrate whether the development of an e-Health tool allows evaluating the degree of senescence in patients with established cardiovascular disease based on clinical, biological and genetic aspects of the patient.

OBJETIVES: Our main objective is to develop an e-Health platform that allows evaluating the degree of biological aging based on the clinical and biological profile of the patient.

To develop this platform, we will analyze the biological senescence pattern measured by the length of telomeres, together with inflammatory response parameters, oxidative stress markers and genetic markers in a population with established cardiovascular disease from the CORDIOPREV study cohort (NCT00924937).

POPULATION, DESIGN AND METHODOLOGY: The CORDIOPREV study is a single-blind, randomized clinical trial of 1002 patients with coronary disease. Relative telomeric length (RTL) was determined at the beginning of the study, as well as the following inflammatory response markers (us-CRP, monocyte chemoattractant protein-1, IL-6, IL-1 β , TNF- α , adiponectin, resistin and leptin), oxidative stress (nitric oxide, lipid peroxidation products, carbonylated proteins, catalase, total glutathione, reduced glutathione,

oxidized glutathione, superoxide dismutase, and peroxidized glutathione) and localized polymorphisms in the FOXO3 gene (*rs2764264* and *rs2802292*).

Biological senescence was defined as the value equal to or less than the lowest quintile of RTL in our population (RTL = 0.7629). We calculated and validated different predictive models through logistic regression, each defined by a set of clinical variables, inflammatory response markers and oxidative stress (baseline model, extended model and reduced model), allowing us to identify patients with biological senescence. Finally, we completed our analysis with a final model in which we included certain genetic variants of the FOXO3 gene.

RESULTS: We selected those patients with all the proposed variables to develop the different predictive models ($n = 353$). After comparing both groups (biological senescence versus no biological senescence), significant differences were identified for the following parameters: total cholesterol, catalase, superoxide dismutase, IL-1 β , resistin and leptin. The beta coefficients of the variables that can predict the risk of biological senescence were calculated using logistic regression, defining biological senescence as a dependent variable in each model and different biomarkers as covariates according to the model. In the baseline model, age, gender, body mass index, waist circumference, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, heart rate, HDL cholesterol, fasting triglycerides, us-CRP and HOMA-IR were included; the extended model included the parameters of the baseline model together with total glutathione, reduced glutathione, oxidized glutathione, peroxidized glutathione, catalase, superoxide dismutase, carbonylated proteins, nitric oxide, lipid peroxidation products, monocyte chemoattractant protein-1, TNF- α , adiponectin, IL-1 β , IL6, resistin and leptin; in the reduced model, the baseline model parameters were included together with catalase, superoxide dismutase, lipid peroxidation products, IL-1 β and resistin. Next, we draw the ROC curves and use the area under the curve to evaluate the predictive capacity of each model,

selecting the extended model and the reduced model as the most efficient, with the area under the ROC curve in those models being 0.75 and 0.72 respectively. Finally, we completed our analysis by including the information provided by the FOXO3 gene polymorphisms to the reduced model, calling it the genetic model. After calculating the model, we plotted the ROC curve and the area under the curve (AUC ROC = 0.74), providing a slight improvement in the prediction capacity.

CONCLUSIONS: Our study has identified different predictive models that allow us to calculate the degree of biological senescence in coronary patients, thus being able to identify a subgroup of patients with higher risk and who may require more exhaustive management and more intensive treatment.

II. INTRODUCCIÓN

1. ENVEJECIMIENTO.

1.1 El envejecimiento como proceso natural.

El envejecimiento es un proceso biológico complejo que ocurre a nivel celular, molecular y genético en el que se produce un deterioro de las funciones fisiológicas y reproductivas necesarias para nuestra supervivencia con el paso del tiempo (1).

Los requisitos que forman parte de un envejecimiento natural son *universalidad* ya que debe ocurrir en todos los individuos de una especie, *irreversibilidad* debido que tenemos una supervivencia limitada, de *carácter progresivo* al tratarse de un proceso y no de un fenómeno repentino, y por último, *degenerativo* ya que implica una pérdida de la capacidad bioenergética y el rendimiento funcional de los seres vivos (2).

Los mecanismos que están involucrados en el proceso de envejecimiento son múltiples, destacando: factores epigenéticos, daño del ADN, disfunción mitocondrial y acortamiento telomérico (3). A nivel celular, se produce un desequilibrio entre el aumento del estrés oxidativo y la capacidad de su respuesta protectora frente a dicho daño, contribuyendo este proceso a la senescencia celular, en la cual, las células dejan de proliferar y se vuelven disfuncionales. Como consecuencia, se acumulan las especies reactivas de oxígeno (ROS), que inducen un aumento en la secreción de moléculas inflamatorias que afectan a la propia célula y al tejido circundante. La respuesta de nuestro organismo al daño inducido es generar un proceso de inflamación crónica (3). Por todo esto, el proceso de envejecimiento podría entenderse como una acumulación de células senescentes en tejidos y órganos envejecidos.

El aumento en la esperanza de vida es uno de los mayores avances del siglo XXI, el cual está directamente relacionado con el envejecimiento progresivo de la población. Según la Organización Mundial de la Salud, en 2050 el 22% de la población tendrá más de 60 años. Por otro lado, hablamos de la transición epidemiológica del siglo XX, por la cual, la principal causa de mortalidad serán las enfermedades crónicas

relacionadas con la edad, como son las enfermedades cardiovasculares, el cáncer o la diabetes, sustituyendo en el ranking a las enfermedades transmisibles (4).

En la sociedad actual, el envejecimiento cronológico se asocia con el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad, como son la insuficiencia cardiaca, la diabetes o la arterioesclerosis, demostrando por diversos estudios que la acumulación de células senescentes tiene un papel causal en dichas patologías (5), dando como resultado un deterioro en la calidad de vida al limitar las actividades normales de los pacientes.

Cada día se otorga más importancia no solo a prolongar la longevidad, sino que esta sea lo mas saludable posible, permitiendo evaluar el número de años vividos, la calidad de vida y la ausencia de discapacidad en dichos años (6).

1.2 El envejecimiento biológico y la patología cardiovascular.

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de mortalidad a nivel mundial y están estrechamente relacionadas con el envejecimiento. Según la OMS producen aproximadamente el 30% del total de muertes anuales, siendo la primera causa de muerte en la población mayor de 65 años (7).

Son múltiples los factores de riesgo implicados en el desarrollo de la patología cardiovascular, destacando la edad como el principal factor (8), asociado a otros: hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, consumo de tabaco, etc., estimando que la esperanza de vida de estos pacientes es menor respecto a la población general (9). La consecuencia fundamental es la limitación en la calidad de vida de los pacientes y su entorno familiar implicando enormes costes para el sistema sanitario (10).

Uno de los objetivos de la medicina actual es modificar o modular los diferentes factores de riesgo asociados a la patología vascular, de modo que, controlando la tensión arterial, reduciendo los niveles de colesterol, aumentando la actividad física,

suprimiendo el consumo de tabaco y alcohol o adoptando modelos dietéticos saludables, podremos modificar la incidencia de esta enfermedad. Casualmente, todas las recomendaciones indicadas para mejorar el control de las enfermedades cardiovasculares permiten que las personas de edad avanzada tengan un envejecimiento saludable.

La senescencia vascular está implicada en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular y los trastornos metabólicos, ya que promueve la arterioesclerosis (11). Las células endoteliales envejecidas son disfuncionales, presentando una disminución de la proliferación y migración, minimizando la expresión de moléculas angiogénicas y reduciendo la producción de óxido nítrico, como consecuencia se produce un deterioro de la dilatación dependiente de endotelio favoreciendo la patología cardiovascular (5). Por todo esto, la edad es el factor de riesgo no modificable más importante en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, considerado al mismo tiempo como un factor predictor fundamental del riesgo global de esta patología (12).

En la actualidad, hay diferentes sistemas de puntuación para predecir el riesgo de enfermedad cardiovascular incluyendo todos ellos la edad como factor predictor, este es el caso de la ecuación de Framingham (13) y las tablas de SCORE (14), siendo la herramienta más difundida en el ámbito médico para evaluar el riesgo cardiovascular de un individuo, diferenciando el riesgo a corto plazo, es decir un año, o a largo plazo, que serían diez años. De esta forma, un individuo a edad temprana, con varios factores de riesgo asociados, tendrá menor riesgo a corto plazo que una persona mayor con similares factores de riesgo, porque el riesgo absoluto aumenta conforme la persona envejece. Sin embargo, el riesgo relativo es invariable en el tiempo, si no se modifican el resto de factores de riesgo (12).

Por todo esto, la carga de riesgo asociada con el envejecimiento se podrá reducir si modificamos el resto de los factores de riesgo tradicionales coexistentes, reduciendo la comorbilidad y mejorando la calidad de vida (15).

1.3 Los mecanismos del envejecimiento.

El envejecimiento se caracteriza por una pérdida progresiva de la integridad fisiológica produciendo un deterioro funcional y una mayor vulnerabilidad a la morbimortalidad (16). Este proceso es el principal factor de riesgo para el desarrollo de diversas patologías entre las que incluimos las enfermedades cardiovasculares (17), la diabetes (18), el cáncer (19) y las enfermedades neurodegenerativas (20). Por este motivo, las investigaciones para conocer los mecanismos implicados en el proceso de envejecimiento se han incrementado en los últimos años. Permitiendo estos avances identificar dianas terapéuticas que consigan mejorar la salud en esta fase de la vida, minimizando los efectos secundarios (21).

En una revisión sobre marcadores de envejecimiento se intentan identificar y clasificar las características celulares y moleculares del envejecimiento, proponiendo nueve señales cuya modulación permitiría acelerar o retrasar el proceso de senescencia normal. Estas son: inestabilidad genómica, acortamiento telomérico, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, desregulación de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de células madre y alteración de la comunicación intercelular (22).

La inestabilidad genómica podemos entenderla como la acumulación del daño genético a lo largo de la vida (23). La integridad y la estabilidad del ADN está continuamente atacada por factores físicos, químicos y biológicos exógenos, pero también por procesos endógenos como ROS o reacciones hidroelectrolíticas (24). La consecuencia son mutaciones, translocaciones, pérdidas cromosómicas, para lo cual las células han desarrollado unos mecanismos de reparación del ADN (25), que manteniéndose íntegros pueden retrasar el envejecimiento.

Los telómeros son regiones cromosómicas susceptibles de deteriorarse con la edad. Las células somáticas sufren el proceso de acortamiento telomérico, limitando su capacidad proliferativa, concepto denominado “senescencia replicativa” (26). El

acortamiento de los telómeros se observa en el envejecimiento natural de los humanos (27), pero en edades más tempranas se asocia a un aumento en el riesgo de mortalidad (28).

Los cambios epigenéticos implican alteraciones en la metilación del ADN, remodelación de cromatina y modificación pos-translacional de histonas. De modo que la metilación de las histonas influye en el envejecimiento a través de mecanismos epigenéticos y mediante alteraciones transcripcionales que afectan al metabolismo o las vías de señalización fuera del núcleo (22). La metilación del ADN y las histonas se muestra en síndromes progeroides, al mismo tiempo que están descritas en el envejecimiento fisiológico (29). Las modificaciones en las histonas y el ADN determinan cambios en la cromatina como son la pérdida o redistribución de heterocromatina, constituyéndose como datos característicos del envejecimiento (30).

La proteostasis implica mecanismos de estabilización de las proteínas plegadas correctamente, eliminando aquellas que no cumplen su función y evitando la acumulación de componentes dañados. Por este motivo, diversos estudios han demostrado que la pérdida de la proteostasis está relacionada con el envejecimiento, y en diversas patologías relacionadas con la edad, como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson, se produce una acumulación de proteínas erróneamente plegadas (31).

La vía de la insulina y la señalización de IGF-1, es la vía de control del envejecimiento más conservada durante la evolución, siendo una de sus dianas la familia FOXO y los complejos mTOR, ambos involucrados en la aceleración del envejecimiento (32). Sabemos que determinados polimorfismos genéticos que modifican las funciones de GH, el receptor de IGF-1 o el receptor de la insulina se han relacionado con la longevidad (32).

La disfunción mitocondrial contribuye al envejecimiento independientemente de la formación ROS (33). La combinación de un mayor daño, como oxidación de proteínas mitocondriales o deleciones del ADN mitocondrial, y un menor recambio en las

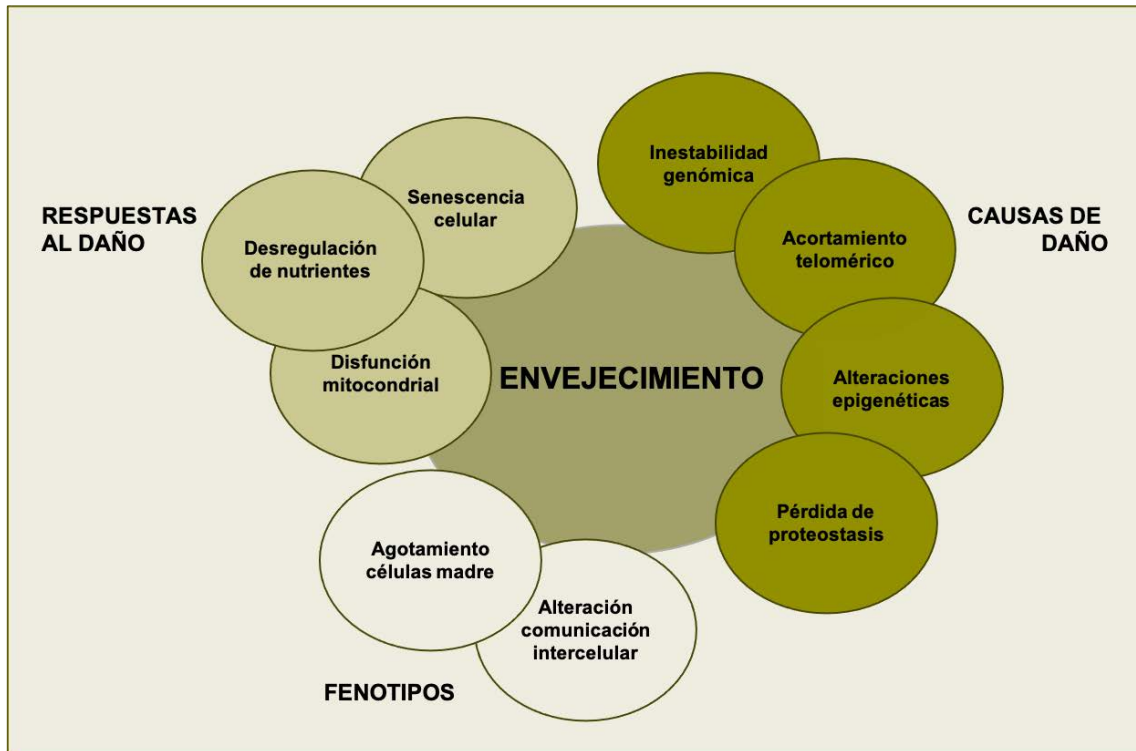
mitocondrias, debido a una disminución en la biogénesis o una reducción del aclaramiento, puede contribuir al proceso de envejecimiento (22).

El propósito fundamental de la senescencia es prevenir la propagación de células dañadas y favorecer su eliminación por parte del sistema inmune. Pero en organismos envejecidos este sistema puede ser deficiente produciendo una acumulación de células senescentes en los tejidos, que agravan el daño y favorecen el envejecimiento (22). Se demostró en un modelo experimental de progeria que la eliminación de las células senescentes retrasa la aparición de enfermedades relacionadas con el envejecimiento (34).

La disminución del potencial regenerativo de las células madre es un proceso obvio del envejecimiento, correlacionado con la acumulación de daño en ADN (35) y la sobreexpresión de proteínas inhibidoras del ciclo celular (36). Debido a la inmunosenescencia, es decir, a una disminución en la producción de las células inmunes adaptativas con la edad, se incrementa la incidencia de anemia o neoplasias hematológicas (37). Este proceso de desgaste de las células madre ocurre en todo tipo de tejidos, como el hueso (38), fibras musculares (39), pudiendo asociarlo al acortamiento de los telómeros (40).

La inflamación es la consecuencia de la acumulación del daño proinflamatorio en los tejidos, la disfunción del sistema inmunitario para eliminar células disfuncionales o patógenos y el aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias por las células senescentes, todo esto induce la activación de vías inflamatorias que aumentan la producción de IL-1, factor de necrosis tumoral o interferón como respuesta (41). Al mismo tiempo, la inflamación está involucrada en la arterioesclerosis, la diabetes o la obesidad, relacionados a su vez con el envejecimiento.

Figura 1. Los marcadores de envejecimiento. La figura representa las nueve señales de envejecimiento, cuya modulación permitiría acelerar o retrasar el proceso de senescencia.



2. RELAVANCIA CLÍNICA DEL ACORTAMIENTO DE LOS TELÓMEROS.

Los telómeros forman una estructura heterocromática al final de los cromosomas que los protege de la degradación y las actividades de reparación y recombinación de ADN, convirtiéndose en esenciales para mantener la estabilidad cromosómica (42, 43). Los telómeros se acortan con cada división celular, debido a la replicación incompleta de moléculas lineales de ADN por las polimerasas, denominado este proceso “problema de la replicación final” (44).

La telomerasa es una enzima presente en células madre pluripotentes que compensa el desgaste de los telómeros por la adición de oligonucleótidos al extremo de los cromosomas de las células donde se expresa, aunque esto no es suficiente para

contrarrestar el desgaste de los telómeros debido a la división celular, produciéndose un acortamiento progresivo y afectando a la capacidad regenerativa de los tejidos, constituyéndose como uno de los sellos moleculares del envejecimiento (45). Por este motivo, cuando los cromosomas se acortan, el ADN envía señales de daño, y si este daño es irreparable, conduce a la detección del crecimiento y desencadena la senescencia celular (46). El acortamiento de los telómeros es un sello distintivo del envejecimiento molecular y está asociado a la aparición prematura de enfermedades asociadas con el envejecimiento (47).

La proteína p53 es un factor de transcripción con un papel crucial en el mantenimiento de la estabilidad genómica que media la coordinación de la reparación del ADN, la apoptosis y la senescencia celular, por esto se le conoce como “el guardián del genoma” (5). La señalización de p53 se activa principalmente por el daño del ADN y la disfunción telomérica (5).

Por todo esto, una mejor comprensión de los mecanismos de senescencia permitirá una el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la salud y prolonguen la vida celular útil, avanzar en terapias basadas en modular la actividad de la telomerasa y que permitan mejorar el tratamiento de enfermedades asociadas con la presencia de telómeros extremadamente cortos, enfermedades relacionadas con la edad y por supuesto al envejecimiento en sí mismo (47).

La longitud de los telómeros de los leucocitos (LTL) se utiliza como biomarcador de envejecimiento biológico y está relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades asociadas al propio envejecimiento como hipertensión arterial (48), diabetes mellitus (49), arterioesclerosis (50) y enfermedades neurodegenerativas (51). Por otro lado, los estudios epidemiológicos muestran una asociación entre la LTL y la mortalidad (52, 53).

Existe una asociación constante entre los LTL y la arterioesclerosis, así el envejecimiento biológico prematuro determina en las placas de ateroma una proliferación celular reducida, detección del crecimiento y la apoptosis junto con un

desgaste de los telómeros (11). La arterioesclerosis se caracteriza por un estado de inflamación crónica y un aumento del estrés oxidativo, factores que influyen en la longitud de los telómeros (54). El acortamiento de LTL en pacientes con arterioesclerosis puede provenir de un aumento en la replicación de células madre para sustituir los leucocitos consumidos en el proceso inflamatorio junto con la pérdida de los telómeros por la replicación (55). Tras sufrir un infarto agudo de miocardio la expresión y la actividad de la telomerasa se incrementa en los cardiomiocitos y las células endoteliales. La telomerasa favorece la reparación tisular, y por lo tanto se ha sugerido como un elemento candidato para la terapia génica, pudiendo modular las enfermedades cardiovasculares (56). Diversos estudios demuestran que la terapia con estatinas se asocia a una mayor actividad de la telomerasa independientemente de múltiples factores como: edad, género, consumo de tabaco, perfil lipídico o estado inflamatorio (57, 58).

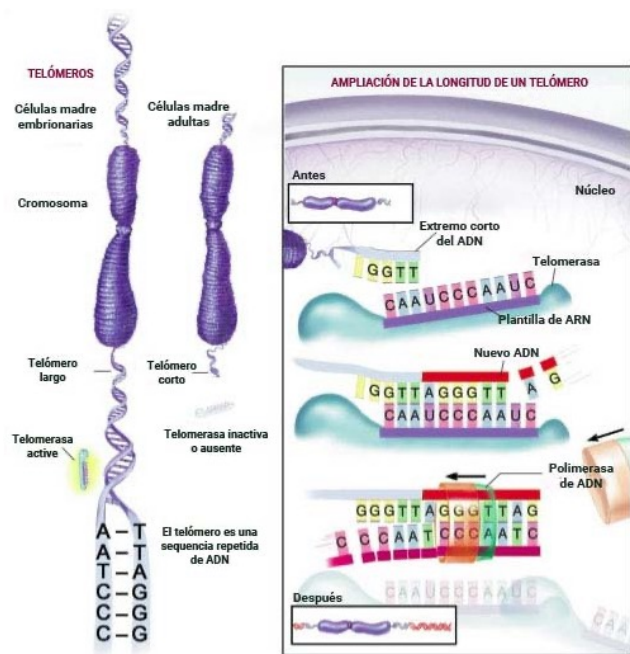


Figura 2. Los telómeros y la acción de la telomerasa. Ilustrado por Terese Winslow.

Por lo tanto, la actividad de la telomerasa y la longitud de los telómeros juegan un papel crucial en el desarrollo de determinadas enfermedades, siendo los telómeros un potencial objetivo terapéutico para modular el envejecimiento celular (42).

3.- FACTORES GENÉTICOS Y ENVEJECIMIENTO.

Diferentes factores genéticos se han implicado en el envejecimiento, las mutaciones en el ADN genómico y mitocondrial son una consecuencia de la alteración del proceso de reparación, y conduce a una disfunción de las células madre somáticas. Un claro ejemplo de la implicación de los factores genéticos son los síndromes progeroides humanos que ocurren como consecuencia de la mutación de un gen (59), entre estas patologías destacamos el síndrome de Werner (60), síndrome de Bloom (61), síndrome de Rothmund-Thomson (62) y síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (63). En concreto el síndrome de Hutchinson-Gilford, en el que se produce una progeria severa, participan cambios moleculares relacionados con el envejecimiento fisiológico como la inestabilidad del genoma, el acortamiento de los telómeros y una homeostasis defectuosa de las células madre, sin embargo, en estos pacientes se aceleran estos cambios induciendo el envejecimiento precoz (64).

En los últimos años, se han realizado diferentes estudios que ayudan a explicar la genética de la longevidad humana, identificando polimorfismos en genes que codifican proteínas que influyen en determinadas vías de un organismo modelo y afectan a la esperanza de vida, estos genes pueden participar en los diferentes procesos que determinan el envejecimiento como son: la resistencia al estrés oxidativo, en la reparación del ADN, en la función mitocondrial, en el acortamiento de los telómeros, en el control del ciclo celular, entre otros (65-67). Actualmente, la base de datos GenAge (68) proporciona más de 300 genes relacionados con el envejecimiento y LongevityMap

(69) contiene más de 500 entradas indicando genes, loci y variantes estudiadas en el contexto de la longevidad humana y el envejecimiento saludable.

Dos de los genes que se han relacionados con la longevidad en diferentes estudios son APOE y FOXO3 (67).

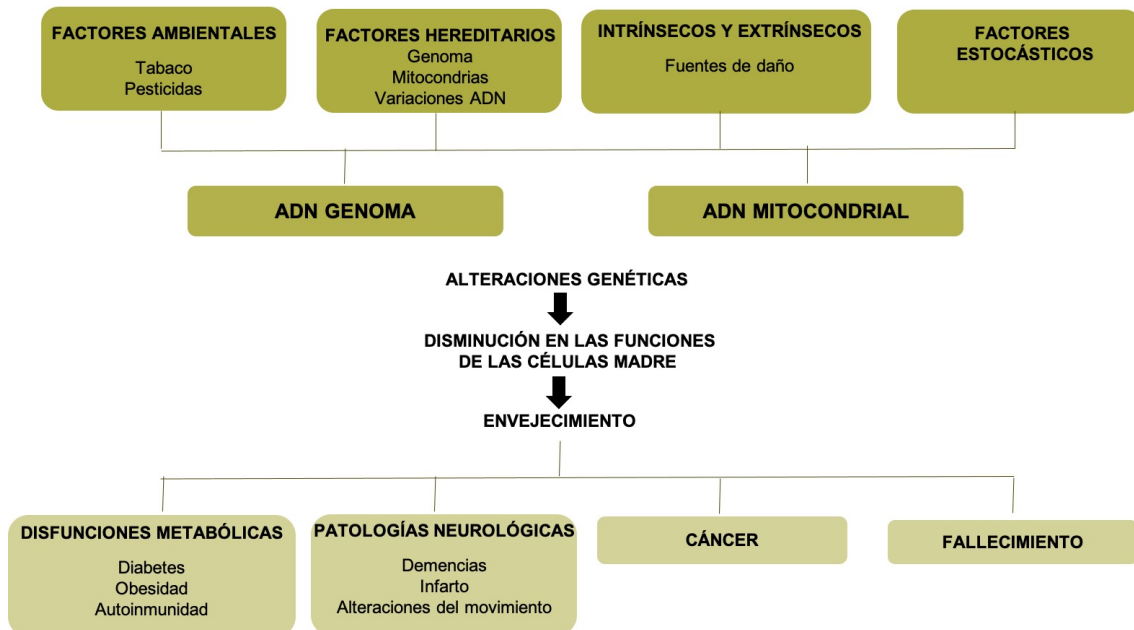
El gen de la apolipoproteína E (APOE) codifica uno de los tres alelos comunes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, producido a partir de la combinación de dos SNPs no sinónimos. El primer estudio que se realizó en centenarios en 1994 encontró una frecuencia baja del alelo $\epsilon 4$ y alta del alelo $\epsilon 2$ (70). La variante $\epsilon 4$ se asocia con un riesgo elevado de enfermedades relacionadas con el envejecimiento entre las que se encuentra la arterioesclerosis (71). Las personas portadoras del alelo $\epsilon 4$ presentan niveles más bajos de APOE y más elevados de colesterol total (CT) y lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), lo que supone un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (71, 72). Un meta-análisis basado en 30 estudios e incluyendo un total de 11.800 pacientes con enfermedad coronaria concluyó que el genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ se asocia con un aumento del 45% del riesgo de patología coronaria en pacientes caucásicos, mientras el alelo $\epsilon 2$ se asoció con una disminución del 16% del riesgo (73). Los japoneses centenarios tienen una frecuencia de alelo $\epsilon 4$ extremadamente baja (74). Estudios posteriores establecen una relación entre $\epsilon 2/\epsilon 2$ y la longevidad en poblaciones del sur de Europa (75).

Los factores de transcripción del grupo O (FOXO) son indispensables en la vía de señalización de la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), conocida como vía IIS (señalización de insulina/IGF-1), implicada en el fenómeno de la longevidad (76). Determinadas mutaciones en genes que participan en la vía IIS indica que los factores de transcripción FOXO son cruciales para la longevidad, al regular la expresión de genes relacionados con el metabolismo, el estrés oxidativo, la apoptosis y otros procesos metabólicos (77). Los mamíferos tienen cuatro genes FOXO: FOXO1, FOXO3, FOXO4 y FOXO6. Diversos estudios han mostrado la asociación del gen FOXO3 con la longevidad (78-80), el primero realizado en 8.006 estadounidenses de

ascendencia japonesa pertenecientes al Hawaii Lifespan Study (81), donde se demostró una fuerte asociación entre ambos, a su vez las personas con más longevidad mostraron un envejecimiento más saludable, con una menor asociación a enfermedades cardiovasculares y cáncer. En un estudio reciente, del Kuakini Honolulu Heart Program, se identificaron todos los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de FOXO3, mostrando que 41 de ellos estaban asociados a la longevidad, incluyendo en la población de estudio 187 estadounidenses con ascendencia japonesa mayores de 95 años (82). Los investigadores muestran puntos de contacto de FOXO3 con 46 genes vecinos en el cromosoma 6, de modo que cuando este factor de transcripción se activa por estrés celular se visualiza el movimiento hacia estos genes, considerando que además de su papel como factor de transcripción que regula la expresión génica en todo el genoma puede regular genes vecinos, convirtiéndose en un centro de envejecimiento (82).

Sin embargo, los mecanismos que explican el proceso del envejecimiento aún no están claros, pudiendo ejercer un papel clave las herramientas genéticas para explicar las diferencias interindividuales observadas en la población. Los factores implicados en el resultado final son múltiples, influyendo los factores ambientales, factores hereditarios, factores intrínsecos y extrínsecos o los factores estocásticos, pueden inducir alteraciones genéticas y epigenéticas causando una disminución en la función de las células madre somáticas, y como consecuencia inducir una disfunción metabólica y desarrollando enfermedades como diabetes mellitus, obesidad o enfermedades autoinmunes; en segundo lugar, patologías degenerativas, como demencias, infarto cerebral o alteraciones del movimientos; y por últimos aparición de cáncer o envejecimiento en los individuos.

Figura 3. Factores genéticos y envejecimiento. Adaptado de Rodríguez-Rodelo et al (53).



4. ENVEJECIMIENTO Y ESTADO PROINFLAMATORIO CRÓNICO.

El envejecimiento se asocia al desarrollo de un estado proinflamatorio crónico de bajo grado, caracterizado por un incremento en los marcadores inflamatorios en células y tejidos, convirtiéndose en un factor clave para la aparición de múltiples enfermedades crónicas relacionadas con la edad, entre las que se encuentra la enfermedad cardiovascular (83), el cáncer (84), la enfermedad renal (85), la demencia (86) o la depresión (87), y favoreciendo la discapacidad en las actividades diarias, la fragilidad y la muerte prematura (88).

El estado proinflamatorio se define por niveles elevados de determinados marcadores como son IL-1, IL-6, IL-8, proteína C reactiva (PCR), IFN- α , IFN- β , factor de necrosis tumoral (TNF), sus receptores solubles (receptores TNF 1A y 1B) y amiloide A sérico, encontrando a su vez niveles elevados de estos parámetros en la mayoría de

los ancianos (89). Por este motivo, la inflamación se considera un marcador de envejecimiento acelerado y se constituye como uno de los pilares de la biología del envejecimiento (90).

El principal estímulo inflamatorio son moléculas endógenas alteradas resultantes de células o tejidos dañados reconocidos por el sistema inmunológico que promueve su eliminación, produciéndose una disminución de este fenómeno defensivo en la vejez y favoreciendo la aparición o progresión de enfermedades crónicas (91).

Por otro lado, la inflamación ha sido seleccionada evolutivamente como mecanismo defensivo en las infecciones, previniendo el cáncer y reparando los tejidos dañados. Su efecto es positivo si se activa de manera transitoria, tras un despliegue rápido, respondiendo de forma adecuada, eliminando el problema y retrocediendo al estado de reposo inicial; sin embargo, el problema surge cuando la inflamación se convierte en un proceso crónico (92).

Entre las citoquinas proinflamatorias, la IL-6 está implicada de forma notable en la enfermedad vascular asociada a la edad, correlacionándose sus mayores niveles con una mayor discapacidad y mortalidad en personas mayores (93). Los niveles de PCR se asocian con una mayor rigidez arterial en ancianos (94) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) tiene una mayor expresión en la íntima arterial engrosada de los vasos de los adultos mayores comparada con los jóvenes (95).

Como sabemos, la arterioesclerosis se origina por una acumulación de partículas de c-LDL oxidadas en el endotelio de la pared arterial, desencadenando una respuesta inflamatoria que conduce a una progresión de la aterogénesis. Los monocitos migran hasta la íntima de la pared vascular se diferencian en macrófagos y posteriormente en células espumosas liberando citoquinas que atraen diferentes células inflamatorias que promueven la arterioesclerosis, la cual evoluciona en el tiempo desde la disfunción endotelial hasta el desarrollo de complicaciones trombóticas (96). En este entorno proinflamatorio las células del músculo liso vascular sufren daño en su ADN y junto con un acortamiento de los telómeros, se constituyen como marcadores de senescencia,

produciendo una pérdida de la proliferación celular y favoreciendo la apoptosis (97). Por lo tanto, la inflamación crónica podemos considerarla tanto un factor de riesgo como un mecanismo patogénico de enfermedad cardiovascular.

Estudios longitudinales demuestran que niveles elevados de marcadores inflamatorios como IL-6, TNF- α o PCR son predictores de riesgo independientes de enfermedad cardiovascular en adultos jóvenes y población mayor (98). El factor de transcripción NF- κ B, considerado como el regulador de múltiples moléculas inflamatorias, presenta en estudios realizados en humanos una mayor expresión y actividad en las células endoteliales de adultos mayores comparadas con adultos jóvenes (99). Este proceso se relaciona claramente con el desarrollo de disfunción endotelial. Existe una interacción entre la inflamación y el estrés oxidativo, ROS y H₂O₂, producidos por las células endoteliales y musculares de las arterias, activan factores de transcripción como NF- κ B que aumenta la expresión génica de citoquinas (IL-1, IL-6, TNF), moléculas de adhesión (VCAM, ICAM) o enzimas proinflamatorias (iNOs, COX-2) favoreciendo la senescencia vascular (100).

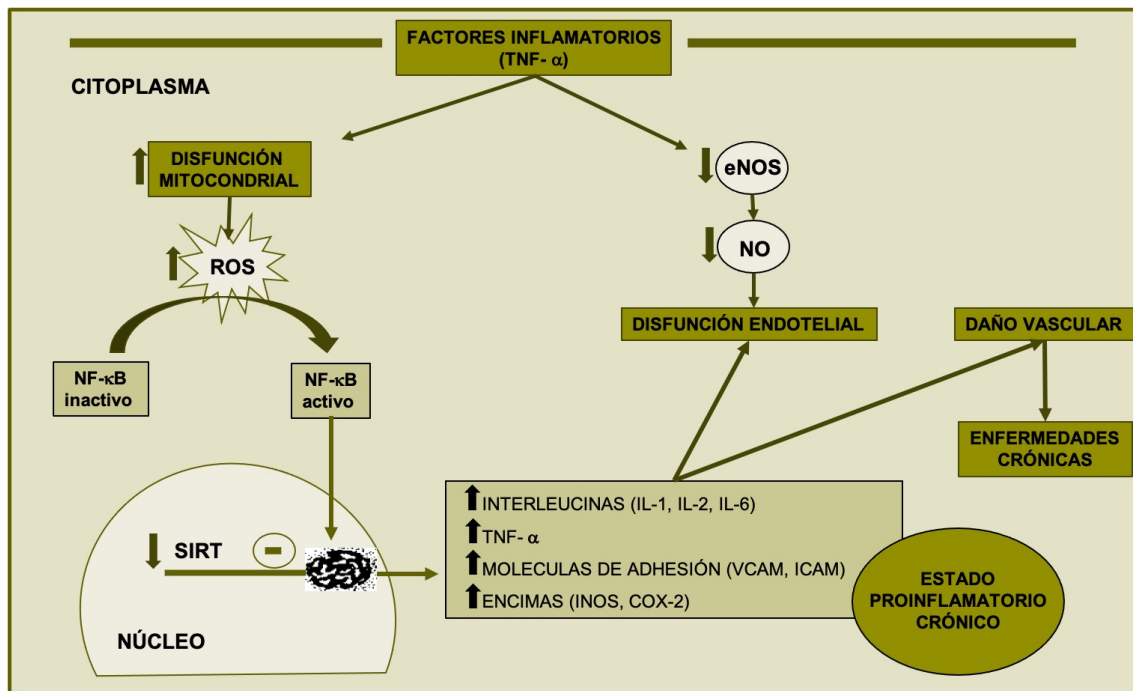
Por otro lado, de forma experimental en ratones, se observó que la inhibición funcional de la señalización endotelial de NF- κ B previno el desarrollo de resistencia a la insulina y de senescencia vascular relacionada en la edad, con una disminución del estrés oxidativo, un aumento del flujo sanguíneo muscular y una actividad física mejorada (101).

Una de las intervenciones que modifica la longevidad en modelos animales es la restricción calórica, asociada con una reducción de los biomarcadores inflamatorios, produciendo una disminución de ROS y consecuentemente reduciendo la activación del factor de transcripción NF- κ B (102). Por esto motivo, la restricción dietética reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular en modelos animales y en humanos (103).

Modular la inflamación es una estrategia prometedora en la prevención de la enfermedad cardiovascular y al mismo tiempo frenar el deterioro de la salud producido

por el envejecimiento, aunque lo más probable es que la inflamación solo se pueda modificar en una etapa inicial en la que los mecanismos compensadores del organismo no se agoten. No obstante se precisan más evidencias que estudien la influencia de la inflamación sobre el desarrollo de enfermedad cardiovascular, multimorbilidad, discapacidad y fragilidad (92) y si modulando dicha inflamación se puede mejorar el pronóstico y la evolución de las mismas.

Figura 4. Estado proinflamatorio crónico. Diferentes mecanismos de acción de la inflamación, factores asociados al envejecimiento y las enfermedades crónicas. Adaptado de El Assar et al (104).



Abreviaturas: TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa, ROS: especies reactivas de oxígeno, NF- κ B: factor de transcripción nuclear kappaB, SIRT: sirtuina, eNOS: oxido nítrico sintetasa endotelial, NO: oxido nítrico.

5. ENVEJECIMIENTO Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Todas las células aeróbicas producen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) que juegan un papel fundamental en el desarrollo del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad (105). La teoría del envejecimiento por el estrés oxidativo (106) se basa en la hipótesis según la cual, el daño estructural de la pérdida de las funciones asociadas a la edad se debe a la acumulación de daño oxidativo por las RONS en lípidos, proteínas y ADN que induce el proceso de senescencia celular.

Existen fuentes endógenas y exógenas de RONS. Entre las endógenas destacamos NADPH oxidada como fuente predominante del radical superóxido (O_2^-) y el ion hidroxilo (OH^\cdot), que reaccionan fundamentalmente con los fosfolípidos de las membranas celulares y las proteínas. El óxido nítrico (NO) producido por tres isoformas de óxido nítrico sintetasa (NOS); destacando la isoforma endotelial (eNOS), relacionada con la vasodilatación y la regulación vascular. El NO puede reaccionar con O_2 y formar una nueva molécula reactiva, el peroxinitrito ($ONOO^-$). Entre las fuentes exógenas de RONS destacan: contaminación, tabaco, alcohol, metales pesados, fármacos, radiación, etc., metabolizándose dentro del organismo en radicales libres. Como ya hemos comentado, el daño celular se produce en lípidos, proteínas y ADN, provocando la aparición de proteínas carboniladas, en segundo lugar, productos de peroxidación lipídica, destacando LDL-oxidadas y, por último, mutaciones en el ADN (107).

Para proteger los sistemas biológicos de la toxicidad de los radicales libres disponemos de antioxidantes endógenos y exógenos. Los antioxidantes endógenos incluyen vías enzimáticas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutathion peroxidasa (GPx); junto a otros antioxidantes no enzimáticos como la bilirrubina, la albúmina o el ácido úrico. Entre los antioxidantes exógenos destacamos: ácido ascórbico, tocoferol, fenoles, lecitinas, selenio, zinc y determinados fármacos como la acetilcisteína (108).

El estrés oxidativo es consecuencia del desequilibrio entre la formación y la eliminación de las RONS. Dicho desequilibrio puede deberse a una sobreproducción o alteración en la capacidad para eliminar o neutralizar dichas partículas, y posteriormente reparar el daño causado (109), todo ello desencadena el fenómeno de senescencia celular.

Las células senescentes adquieren un fenotipo, denominado fenotipo secretor asociado a la senescencia, que implica la secreción de factores como interleucinas o factores de crecimiento, de enzimas degradantes como metaloproteasas de matriz y de proteínas insolubles. Al interactuar con RONS incrementan la producción de IL-1 β que conduce a un estado proinflamatorio, aumentando la actividad de NF- κ B, induciendo la expresión de metaloproteasas de matriz o inhibiendo la actividad de las proteínas FOXO entre otros mecanismos, lo cual favorece la senescencia celular (110).

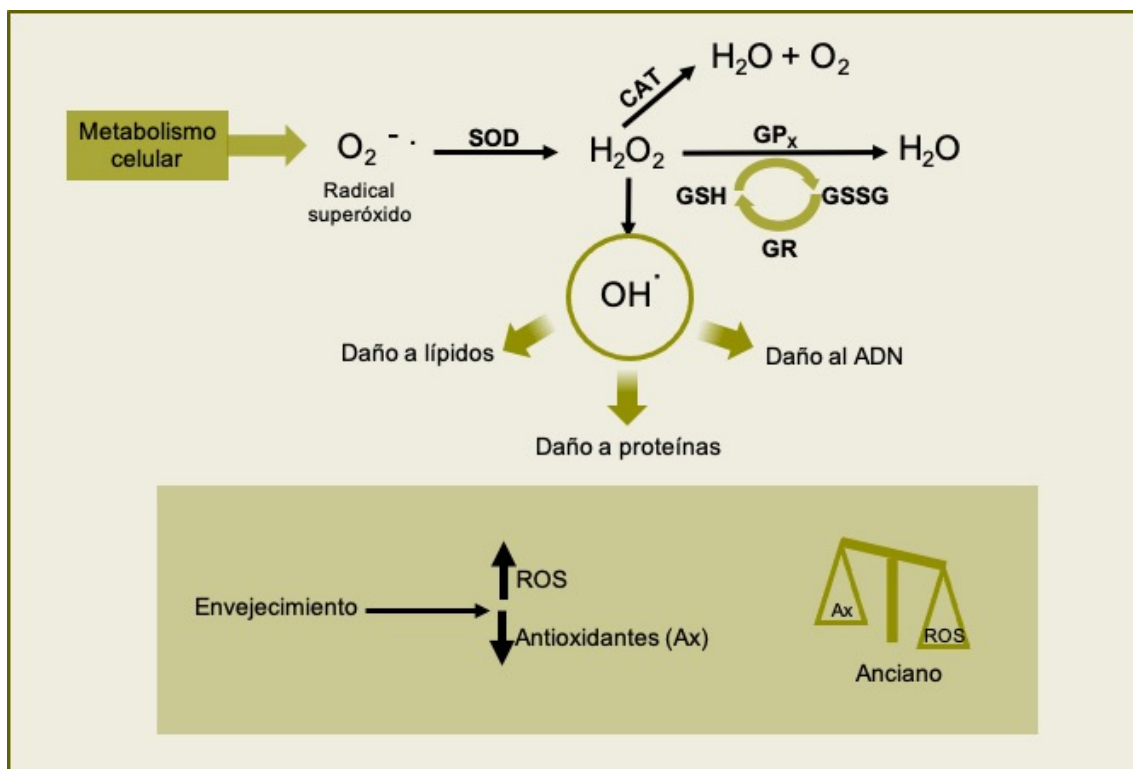
Debido a la estrecha relación entre el estrés oxidativo, la inflamación y el envejecimiento, se postuló la teoría oxidativo-inflamatoria del envejecimiento (111), según la cual, el estrés oxidativo crónico que aparece con la edad afecta a todas las células, especialmente a sistemas reguladores como el sistema nervioso, endocrino e inmunológico, impidiendo una adecuada homeostasis y favoreciendo el desarrollo de patologías crónicas como la enfermedad cardiovascular (112), las enfermedades neurodegenerativas (113), la enfermedad renal crónica (114) o el cáncer (115). El sistema inmunológico ejerce un papel clave en el aumento de la morbimortalidad asociada a la edad, induciendo un estado inflamatorio crónico que asociado al estrés oxidativo crea un círculo y se retroalimenta mutuamente (111).

El estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. La síntesis de NO y la oxidación de c-LDL contribuyen directamente al desarrollo de la aterogénesis y se constituyen como biomarcadores de estrés oxidativo y disfunción endotelial, pudiendo modificarse en el curso del envejecimiento (116). En el estado fisiológico, el NO es un regulador clave de la función endotelial, sin embargo, ante la presencia de ROS, el NO se oxida convirtiéndose en ONOO $^-$, una molécula

oxidante que induce daño celular. La enzima mieloperoxidasa promueve la oxidación de c-LDL y puede limitar la disponibilidad de NO. La SOD, es la enzima responsable de dismutar O_2^- en H_2O_2 , disminuyendo los niveles de O_2^- y protegiendo la disponibilidad de NO para mantener la función endotelial. La disminución de SOD conduce a niveles elevados de vasoconstricción, aumenta el daño mitocondrial y, como consecuencia, produce disfunción endotelial (117).

El envejecimiento vascular considerado como un factor invariable e inexorable se enfoca actualmente como un proceso de intervención para lograr un envejecimiento saludable. De forma que investigaciones en tratamientos basados en la mejora de la bioactividad del NO y la reducción de la oxidación de c-LDL podrían conseguirlo (116).

Figura 5. Estrés oxidativo y envejecimiento. Adaptado de Muñoz-Montero A. RCCV 2017 11(especial):113-119.



Abreviaturas: SOD: superóxido dismutasa, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno, OH^\cdot : ion hidroxilo, CAT: catalasa, GPx: glutatión peroxidada, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, ROS: especies reactivas de oxígeno,

6. RIESGO CARDIOVASCULAR Y ENVEJECIMIENTO.

Un estilo de vida saludable proporciona un beneficio para la salud, pudiendo incluso modificar el riesgo cardiovascular desde edades tempranas (118). Modular los diferentes factores ambientales que definen la enfermedad cardiovascular determina el desarrollo y la progresión de esta patología, incluso en pacientes con edad avanzada. Dicha intervención nos permitirá tener un envejecimiento saludable, aumentando la esperanza de vida y retrasando la aparición de complicaciones propias de la patología vascular (119). Estudios previos realizados en nuestro grupo, demuestran que una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados mejora el estrés oxidativo posprandial en pacientes con SMet, respaldando las recomendaciones de consumir este tipo de dieta como herramienta útil para prevenir las enfermedades cardiovasculares (120).

Otro de los componentes del estilo de vida, la realización de ejercicio físico de forma regular, en una población con edad avanzada, permitirá mejorar su salud vascular, revirtiendo los efectos propios del envejecimiento y preservando la reserva funcional en los pacientes ancianos. Las evidencias demuestran que incluso una mínima cantidad de ejercicio físico moderado diario aumenta la longevidad (121).

Los beneficios a nivel vascular del ejercicio físico incluyen una mejoría en la vasodilatación endotelial, una reducción de la rigidez arterial y permiten disminuir el riesgo cardiovascular en población anciana (122). En un estudio experimental en animales envejecidos, se observó una mejoría en la función endotelial en el momento en el que tuvieron acceso al ejercicio físico regular, evidenciándose un aumento en la expresión y activación de eNOS preservando la biodisponibilidad de NO, junto con una estimulación de la actividad de SOD y una reducción en la expresión de NADPH oxidasa (123).

Por otro lado, adoptar una dieta saludable es una de las estrategias de intervención para prevenir los efectos perjudiciales consecuencia del envejecimiento, y poder reducir la morbilidad asociada al mismo. En modelos animales, la restricción

calórica ejerce a nivel vascular un efecto protector, mejorando la tolerancia a la isquemia del miocardio y retardando la senescencia cardiaca al atenuar el daño oxidativo (124). En un estudio experimental se demostró que la restricción calórica redujo un 30% el grosor de la arteria carótida en animales envejecidos, junto a una disminución en la producción de O_2^- y un aumento en la expresión de NADPH oxidada, SOD y catalasa (125). Estudios realizados por nuestro grupo muestran que el consumo crónico de una dieta mediterránea disminuye la activación de NF- κ B en las células mononucleares (126, 127), al mismo tiempo, el consumo de esta dieta tiene un efecto protector contra la generación de radicales libres mediante la disminución del estrés oxidativo posprandial, influyendo en el desarrollo de las enfermedades asociadas al envejecimiento como las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (128).

En la actualidad esta hipótesis no ha sido del todo confirmada en humanos, es plausible que la restricción calórica aumenta la biodisponibilidad de NO, reduce la generación de ROS, activa la vía de respuesta antioxidante y ejerce efectos antiinflamatorios, permitiendo modular la progresión de la patología vascular asociada al envejecimiento (129). Sin embargo, si está bien establecido el papel de un modelo de dieta saludable de tipo mediterráneo para favorecer un envejecimiento saludable.

Finalmente, destacar que la suplementación con determinados compuestos sintéticos que tienen efectos antioxidantes o antiinflamatorios podría plantearse como beneficioso para prevenir o revertir la disfunción en el envejecimiento. Sin embargo, los estudios sugieren que los hábitos alimentarios saludables, que implican una mayor ingesta de antioxidantes naturales o potenciar los antioxidantes endógenos sería más beneficioso para la patología vascular, ya que el estado antioxidante es más eficaz que la adicción exógena de antioxidantes. Entre estas medidas se incluye la adopción de una dieta mediterránea, complementada con aceite de oliva y frutos secos, la cual disminuye la incidencia de enfermedad cardiovascular (126, 130, 131).

Al comprender los mecanismos moleculares y celulares subyacentes al envejecimiento, obtenemos un conjunto de factores sobre lo que poder actuar para

prevenir o retrasar la disfunción vascular asociada. Entre los mecanismos principales destacamos la inflamación y el estrés oxidativo. En definitiva, cambios en el estilo de vida, como una alimentación saludable o el ejercicio aeróbico en población envejecida permite conseguir este objetivo, reduciendo el riesgo de enfermedad cardiovascular.

7. MEDICINA DE PRECISIÓN.

El término Medicina de Precisión se ha generalizado en los últimos años, siendo su objetivo principal estratificar a los pacientes según una amplia variedad de datos personales, incluyendo información clínica, estilo de vida, características genéticas y diferentes biomarcadores, permitiendo complementar a los clásicos signos y síntomas que definen las diferentes patologías (132).

Al realizar una Medicina de Precisión nos centramos en diferentes objetivos, en primer lugar, los resultados obtenidos a través de las estrategias de tratamiento personalizados, las cuales incluyen el proceso de prescribir a cada paciente un tratamiento específico y dirigido, según las necesidades individuales de cada uno, valorando en todo momento las características fenotípicas, psicosociales, genéticas y la presencia de determinados biomarcadores (133). En segundo lugar, nos centramos en el propio proceso, considerando esta medicina como un modelo que integra diversos datos que permite estratificar a los pacientes en subgrupos con una base común pero diferente susceptibilidad a una enfermedad en particular, ofreciendo soluciones terapéuticas mas precisas (134).

Las visiones de la Medicina de Precisión enfatizan la importancia de un enfoque continuamente actualizado y el desarrollo de herramientas informáticas para ayudar a los sanitarios a interpretar datos y adaptar decisiones en el tratamiento de forma individualizada (135). El grupo de trabajo de la Iniciativa por la Medicina de Precisión en EE. UU. concluyó que una mejor comprensión del inicio y progresión de la enfermedad,

la respuesta al tratamiento y los resultados de salud conducirán a diagnósticos más precisos, estableciendo unas estrategias de prevención de patologías racionales, seleccionando mejor los tratamientos y desarrollando nuevas terapias.

Por lo tanto, se pueden crear modelos que combinen múltiples variables predictoras y nos permitan estimar la probabilidad de resultados o de eventos clínicos particulares, ya sea en ese mismo tiempo (modelo de diagnóstico) o en el futuro (modelo de pronóstico). Uno de los puntos más importantes para la construcción de un modelo es la selección correcta de las variables que lo constituyen. Debemos elegir métodos estadísticos para crear estos modelos, dando como resultado un algoritmo de predicción clínica que pronostica un resultado clínicamente relevante o define variables predictoras, siendo el objetivo final mejorar la atención del paciente (136).

III. HIPÓTESIS

Una de las grandes ambiciones de la medicina actual radica en intentar personalizar el manejo diagnóstico y terapéutico de cada individuo permitiendo obtener una mayor eficiencia en nuestra actuación médica. En los últimos años, hemos sido testigos de un importante avance en este sentido, debido a progresos en el conocimiento y a la tecnología surgida tras la secuenciación del genoma humano, hecho que ha propiciado el desarrollo de distintos test genéticos y aplicaciones informáticas e-Health, las cuales, aunque no exentas de limitaciones, han cambiado nuestra asistencia diaria de los pacientes, sobre todo en algunas disciplinas dentro de ese concepto de Medicina Personalizada y Medicina de Precisión.

Al mismo tiempo, se ha producido un aumento progresivo en la esperanza de vida en los países industrializados, con el consiguiente impacto sanitario, asociado a un alto coste económico, social y humano. Actualmente, no disponemos de una herramienta con una base científica sólida que evalúe el grado de envejecimiento de un paciente con enfermedad cardiovascular y nos permita estratificarlo para posteriormente realizar recomendaciones personalizadas que mejoren su bienestar y optimicen el gasto sanitario.

Nuestra **hipótesis** pretende demostrar si el desarrollo de una herramienta tecnológica e-Health permite evaluar y graduar el grado de senescencia en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida basados en aspectos clínicos, biológicos y genéticos del paciente. La hipótesis nula sería que dicha herramienta no permitiera establecer el grado de envejecimiento biológico.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO PRINCIPAL

Desarrollar una plataforma tecnológica e-Health que permita evaluar y graduar el grado de envejecimiento biológico en pacientes con alto riesgo cardiovascular en base al perfil clínico y biológico del paciente.

Para desarrollar dicha plataforma analizaremos el patrón de senescencia medido por la longitud de los telómeros, parámetros bioquímicos y fenotípicos tradicionales (edad, género, índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, frecuencia cardiaca, colesterol HDL, triglicéridos en ayunas, PCR-us y HOMA-IR), biomarcadores de respuesta inflamatoria (PCR-us, proteína quimiotáctica de monocitos-1, IL-6, IL-1 β , TNF- α , adiponectina, resistina y leptina) y biomarcadores de estrés oxidativo (óxido nítrico, productos de peroxidación de lípidos, proteínas carboniladas, catalasa, glutatión total, glutatión reducido, glutatión oxidado, superóxido dismutasa y glutatión peroxidado), en una población con enfermedad cardiovascular establecida de la cohorte del estudio CORDIOPREV (NCT00924937).

2. OBJETIVO SECUNDARIO

Evaluar la relación del envejecimiento biológico y su interacción con determinados polimorfismos localizados en el gen FOXO3 (*rs2764264* y *rs2802292*), en la misma población de pacientes con enfermedad cardiovascular establecida.

V. POBLACIÓN, DISEÑO Y METODOLOGÍA

1. DISEÑO DEL ESTUDIO.

Nuestro trabajo se ha realizado en el marco del estudio CORDIOPREV (NCT00924937). Este estudio es un ensayo clínico, prospectivo, aleatorizado, simple ciego que incluye a 1002 pacientes con enfermedad coronaria establecida en prevención secundaria. El objetivo principal del estudio es evaluar la eficacia de una dieta mediterránea rica en aceite de oliva en comparación con una dieta baja en grasas para valorar mortalidad y prevenir nuevos eventos cardiovasculares en pacientes con patología coronaria previa.

Los pacientes fueron reclutados desde noviembre de 2009 hasta febrero de 2012, procedentes del Hospital Universitario Reina Sofía, junto a otros hospitales de la provincia de Córdoba y Jaén. El CORDIOPREV ha sido diseñado y realizado por el grupo de Nutrigenómica-Síndrome Metabólico del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba. Los detalles del estudio se encuentran en la web *clinicaltrials.gov*, ya publicadas con anterioridad (137). El protocolo del ensayo y todas sus enmiendas han sido aprobadas por el comité ético del Hospital Universitario Reina Sofía siguiendo las indicaciones de la Declaración de Helsinki y el código de buenas prácticas clínicas.

2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO.

Los pacientes incluidos en el estudio fueron aquellos casos que tenían edades comprendidas entre 20 y 75 años, y hubiesen tenido un evento coronario de más de 6 meses de evolución respecto a la fecha de su inclusión en el estudio, tras aceptar un periodo de seguimiento de 5 años de duración. Los criterios de inclusión y exclusión se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión del estudio CORDIOPREV. Modificado de Delgado- Lista J. Am Heart J. 2016;177: 42–50.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Firma del consentimiento informado aprobado por el Comité de ética del Hospital Universitario Reina Sofía.
- Síndrome coronario agudo:
 - Infarto agudo de miocardio
 - Angina inestable
- Enfermedad coronaria crónica de alto riesgo.

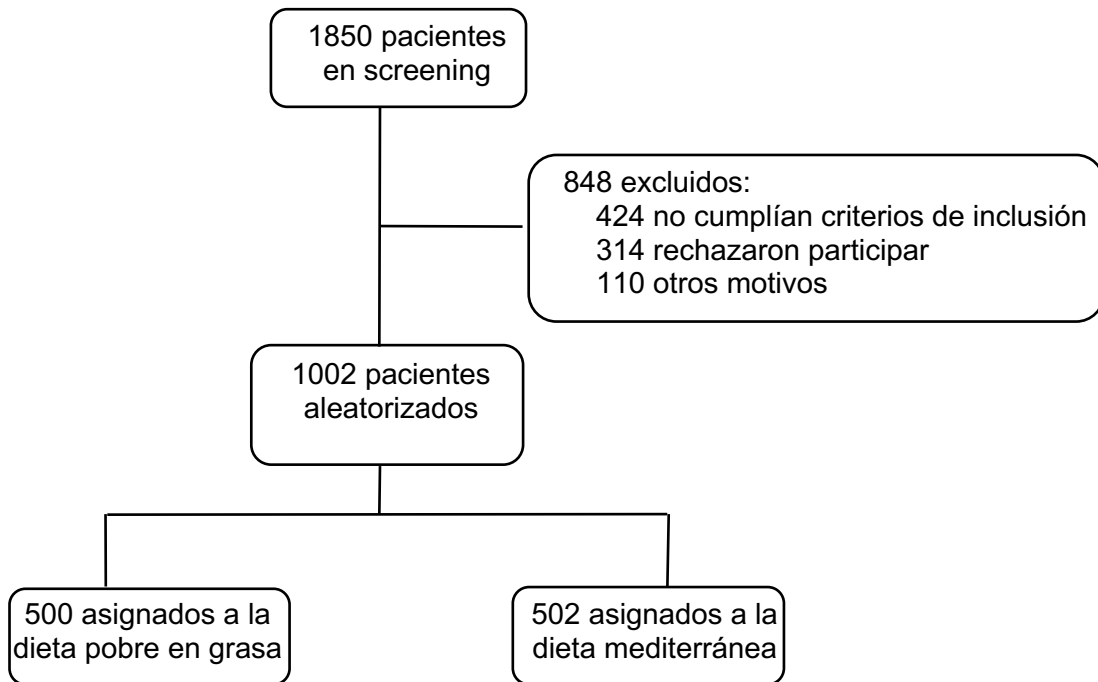
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 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.
- Grado II-IV de insuficiencia cardíaca. Disfunción ventricular izquierda con una FEVI < 35%.
- Incapacidad o impedimento para seguir el protocolo.
- Pacientes con DM2 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 (EPOC) y enfermedades digestivas.
- Participación en otros estudios.

El diagrama de flujo de los pacientes del estudio CORDIOPREV (137) se muestra en la **Figura 6**. Las variables utilizadas para la aleatorización fueron: 1) género (hombre/mujer); 2) edad (≤ 60 años/ ≥ 61 años) y 3) historia de infarto agudo de miocardio previo (sí/no). Con las diferentes combinaciones de estas tres categorías se crearon 8 grupos con los que se aleatorizaron los pacientes en los 2 grupos de intervención. Este proceso se realizó en la Escuela Andaluza de Salud Pública, expertos en el proceso de aleatorización de pacientes en estudios de intervención. La dieta asignada a cada paciente fue comunicada telefónicamente utilizando un sistema de

codificación indicado por el grupo de la Escuela de Salud Pública, para mantener el simple ciego.

Figura 6. Diagrama de flujo de pacientes del estudio CORDIOPREV. Modificado y adaptado de Alcalá-Díaz JF. PLoS One. 2014;9 (5): e96297.



Para el presente análisis se seleccionaron aquellos pacientes que cumplían el mayor número de criterios de Síndrome Metabólico (≥ 4 criterios) del total de la población del estudio. Para la definición de SMet utilizamos los criterios definidos por la *ATP III-NCEP* en su versión modificada (138), los mostramos en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Criterios de síndrome metabólico definidos por ATPIII-NCEP. Grundy SM.

PARÁMETROS	VALORES
Perímetro de cintura elevado*	Definiciones específicas en función de variaciones raciales
TGs elevados o tratamiento farmacológico para la hipertrigliceridemia [⊥]	≥ 150 mg/dL
c-HDL bajo	< 40 mg/dL en hombres < 50 mg/dL en mujeres
Presión arterial elevada o tratamiento farmacológico en un paciente con HTA	TAS ≥ 130 mmHg y/o TAD ≥ 85 mmHg
Glucemia basal alterada o tratamiento farmacológico para la hiperglucemia ^τ	≥ 100 mg/dl

Abreviaturas: c-HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta-densidad, TGs: triglicéridos, HTA: hipertensión arterial.

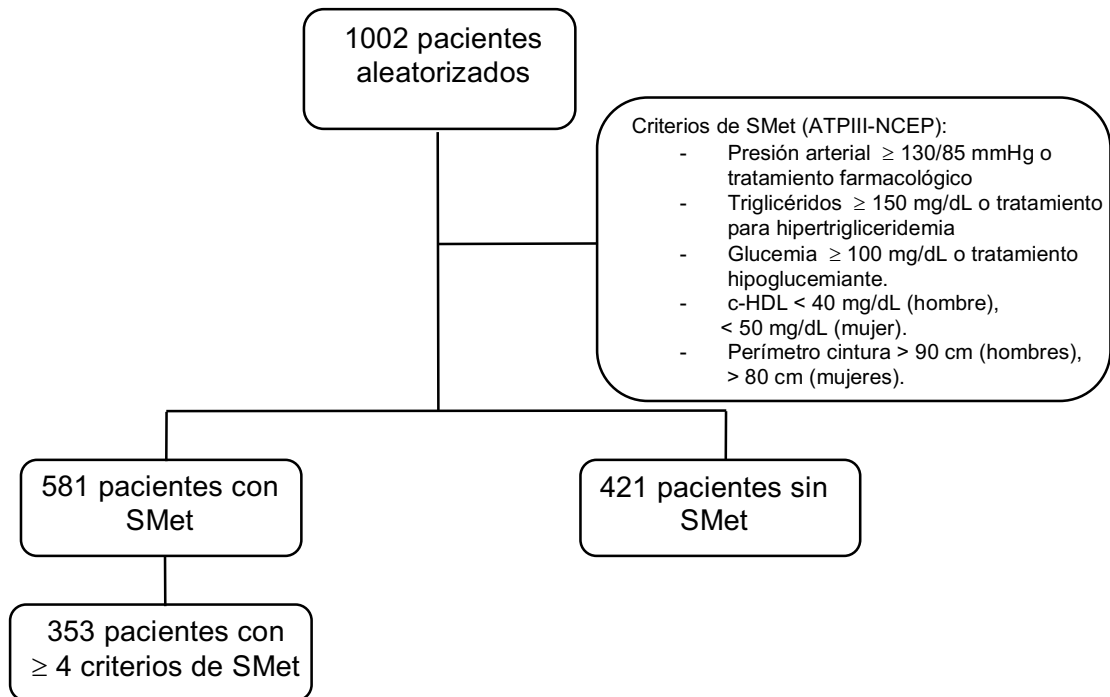
*Se recomienda el uso de los puntos de corte de IDF para sujetos no europeos: H ≥ 90 cm, H ≥ 80 cm; e indistintamente los puntos de corte de la IDF o de la AHA/NHLBI para personas europeas

⊥ Los fármacos más frecuentemente usados para el tratamiento de la hipertrigliceridemia son los fibratos y los ácidos grasos ω-3 a altas dosis.

τ La mayor parte de los pacientes con DM2 tendrá el SMet por los criterios definidos.

Los análisis se realizaron en los pacientes de los que disponíamos de todas las variables clínicas, antropométricas, biomarcadores y longitud de telómeros necesarias para realizarlo, en total n = 353 pacientes. El diagrama de flujo de la selección de los pacientes lo mostramos en la **Figura 7**.

Figura 7. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en nuestro análisis.



3.- EVALUACIÓN DE VARIABLES GENERALES.

Al inicio del estudio y en cada visita anual, dietistas experimentadas recogieron varios cuestionarios con datos sociodemográficos y diferentes variables sobre el estilo de vida de los pacientes. La actividad física y la actividad de tiempo libre se evaluaron por la versión española validada del “*Minnesota physical activity questionnaire*” (139).

Durante la valoración basal de los pacientes incluidos en el estudio, el equipo médico, formado por especialistas en Medicina Interna, realizó un cuestionario clínico, incluyendo la anotación de la medicación prescrita, realizó una exploración física y se firmaron los consentimientos informados.

4.- EVALUACIÓN ANTROPOMÉTRICA.

El peso y la estatura se midieron por dietistas utilizando una báscula (*BF511 Body Composition Analyzer/Scale, OMRON, Japón*) y un tallímetro calibrados (*Seca 242, HealthCheck Systems, Brooklyn, NY*), respectivamente. La circunferencia de la cintura se midió a mitad de camino entre la última costilla y la cresta ilíaca usando una cinta antropométrica. El índice de masa corporal se calculó como el peso por metro cuadrado (Kg/m²). Las medidas se tomaron tanto al inicio del estudio como en el seguimiento.

5.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

Las determinaciones bioquímicas de los pacientes se obtuvieron después de un ayuno de 12 horas, al comienzo del estudio y una vez al año durante el periodo de seguimiento. Se tomaron muestras de sangre venosa, para analizar niveles de insulina, glucosa, lípidos y lipoproteínas, de la vena antecubital y se recogieron en tubos vacutainer que contenían EDTA y se separó el suero de los glóbulos rojos por centrifugación a 1.500 x g durante 15 minutos a 4°C y se congeló a – 80°C inmediatamente. En el presente trabajo, hemos utilizado la información sobre parámetros bioquímicos obtenidos en el tiempo basal.

Los parámetros séricos se midieron en analizadores Architect c-16000 (*Abbott®, Chicago, IL, EE. UU.*), utilizando las siguientes técnicas espectrofotométricas: el método de hexoquinasa para glucosa y oxidación-peroxidación para colesterol total, lipoproteína de alta densidad (c-HDL) y triglicéridos (TG). La concentración de lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) se calculó mediante la ecuación de Friedewald (140). La proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us) se determinó mediante ELISA de alta sensibilidad (*BioCheck, Inc, Foster City, CA, EE. UU.*). El índice HOMA-IR (glucosa en ayunas

(mg/dL) x insulina en ayunas (mU/L) /22.5) se considera una medida fiable de la resistencia a la insulina.

5.1 Determinación de biomarcadores inflamatorios.

Las concentraciones plasmáticas o séricas de IL-6, IL-1 β , TNF- α , proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), adiponectina, resistina y leptina se determinaron con kits comerciales ELISA de ensayos inmuno-absorbentes ligados a enzimas disponibles (*R & D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.*).

5.2 Determinación de biomarcadores oxidativos.

Los niveles plasmáticos de los productos de peroxidación lipídica (LPO; uM/L) se determinaron utilizando el kit *Bioxytech® LPO-586 (OxisResearch®, Portland, EE. UU.)*. Las concentraciones plasmáticas de óxido nítrico (ONx; uM/L) se obtuvieron como la suma de las concentraciones de nitrito y nitrato utilizando el kit comercial *Cayman Chemical Nitrate / Nitrite colorimetric (Cayman-Chemical Company, Ann Arbor, MI, EE. UU.)*. La determinación de glutatión total (tG; mM/mg.Hb), el glutatión reducido (GSH; mM/mg.Hb) y la relación GSH/GSSG se midieron en muestras de plasma utilizando los kits *BIOXYTECH® GSH-420, GSH-400 y GSH/GSSG-412*, respectivamente (*OxisResearch®, Portland, EE. UU.*). Los niveles de glutatión oxidado (GSSG; mM/mg.Hb) se calcularon restando GSH del glutatión total. La actividad de glutatión peroxidada (GPx; U/mg.Hb) se midió en muestras de plasma usando el kit de *ensayo de glutatión peroxidasa (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE. UU.)*. Este ensayo se basa en el método descrito por Flohe y Gunzler (141). La actividad de catalasa (U.Actividad/mg.Hb) se midió espectrofotométricamente (*espectrofotómetro UV-1603, Shimadzu*) en muestras de plasma, según Aebi (142), registrando la velocidad de descomposición de H₂O₂ a 240 nm. La actividad de superóxido dismutasa (SOD;

U.Actividad/mg.Hb) se determinó en muestras de plasma mediante ensayo colorimétrico (SOD-525TM de Bioxytech®, OxisResearch®, Portland, EE. UU.). El contenido de proteínas carboniladas (PC; nM/ml) se realizó en muestras de plasma usando el kit comercial Cayman Chemical Protein Carbonyl® (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE. UU.).

Todas las determinaciones de estrés oxidativo se analizaron en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba.

6. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA LONGITUD RELATIVA DE LOS TELÓMEROS POR PCR.

La longitud relativa telomérica (RTL) se determinó al comienzo del estudio, en el tiempo basal, utilizando el método Cawthon (143) por reacción en cadena de la polimerasa (q-PCR) en tiempo real. Estimamos la proporción relativa de ampliación de repetición de telómero normalizado frente a un gen de mantenimiento, el gen RPL13a de la proteína ribosómica del Homo sapiens L13a; S, para todas las muestras. Los resultados para cada PCR se normalizaron a una curva estándar, construida utilizando una muestra de referencia de ADN. Las curvas estándar para los telómeros y las PCR genómicas consistieron en ocho estándares de referencia de ADN (1-25 ng).

Todas las PCR se realizaron por duplicado con el uso de un *termociclador iQ5* (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, EE. UU.) Y el kit *SensiFAST™ SYBRLo-ROX* (Bioline, Londres, Reino Unido). El coeficiente de variación fue del 3,5% para el número de copias repetidas de los telómeros y del 2,2% para el gen de mantenimiento. El perfil del termociclador para ambas ampliaciones comenzó con una incubación de 95 °C durante 3 minutos para activar la polimerasa, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 5 segundos, 54 °C durante 15 segundos. La composición de la mezcla de reacción fue idéntica excepto por los cebadores oligonucleotídicos: 20 ng de ADN de plantilla, 1 x

SensiFASTTM SYBR Lo-ROX, cebador inverso 200 nM y cebador directo 200 nM. La siguiente secuencia corresponde a los cebadores utilizados para la amplificación telomérica (escrito 5 '3'):

TeloFw, CGGTTTGGTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT;

TeloRw, GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT;

RPL13aFw, CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA;

RPL13aRw, TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA.

7. ANÁLISIS GENÉTICO.

7.1 Aislamiento del DNA.

Se obtuvieron células sanguíneas de la capa leucocitaria a partir de las muestras de sangre periférica extraída por venopunción y depositada en tubos de EDTA. El aislamiento de ADN se llevó a cabo mediante el método de precipitación salina, también conocido como *salting out* (144) utilizando 10 mL de tampón *Montreal-Baltimore* (sacarosa 0,32 M, Tris HCl 0,1 mM pH 7,5 MgCl₂ 0,025 mM, Triton X-100 al 1%), se mezcló y centrifugó para separar la fracción nuclear. A continuación, el sedimento nucleico se homogeneizó con 3 ml de tampón de lisis de núcleos (Tris-HCl 10 mM, pH 8,2, EDTA 2 mM, NaCl 0,4 M) y SDS al 10% y proteinasa K. El ADN se precipitó con NaCl 6 M y se lavó con etanol al 100%. Para finalizar, el ADN genómico se extrajo y se resuspendió en 500 µl de tampón 1 X TE. La pureza y concentración de ADN se evaluó por espectrofotometría usando *NanoDrop Nd-2000* (*ThermoFisher, Waltham, MA*).

7.2 Genotipado de los polimorfismos.

El genotipado se llevó a cabo mediante la plataforma *TaqMan SNP OpenArrayTM* de *Applied Biosystems* (ABI) (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Los ensayos

están disponibles en la base de datos *ABI TaqMan SNP genotyping*. Se siguieron las instrucciones del fabricante, cargando las muestras en arrays de genotipado para *OpenArray™*, utilizando el cargador automático *AccuFill OpenArray™*. Los arrays se incubaron en un Termociclador *GeneAmp PCR System 9700 de ABI (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)*, se hicieron ciclos térmicos, de cuatro a seis placas simultáneamente. Cuando se completó la amplificación, las imágenes de fluorescencia se capturaron en el *OpenArray™ TN Imager* y se analizaron los datos con el software *TaqMan Genotyper V 1.3 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)*.

La amplificación del ADN se realizó en un equipo de PCR a tiempo real, utilizando sondas *TaqMan®* que llevan incorporados dos fluoróforos (VIC y FAM) para cada alelo del gen, el mutado y el normal. Esto nos permitió identificar los sujetos homocigotos para el alelo más común (marcados con un tipo de fluoróforo), homocigotos para el alelo menos común (marcado con el otro tipo de fluoróforo) y heterocigotos (marcados con los dos tipos de fluoróforos).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- 5 minutos a 95°C para la desnaturalización del ADN genómico.
- 40 ciclos de:
 - Desnaturalización del ADN genómico a 95°C durante 30 segundos.
 - 60 segundos a 60°C para la unión de los primers al ADN genómico.
 - 30 segundos a 72°C para la extensión de la polimerasa.
- Las muestras se conservaron en las placas a 4°C.

Posteriormente se llevó a cabo la lectura de fluorescencia para VIC y FAM para obtener seguidamente los datos de frecuencia alélica en cada genotipo mediante el software especificado previamente. Para comparar nuestras frecuencias alélicas se utilizó la base de datos *1000GENOMES* (<http://www.1000genomes.org/1000-genomes-browsers>).

7.2.1 Genotipado de los polimorfismos *rs2764264* y *rs2802292* localizados en el gen *FOXO3*.

El gen *FOXO3* que codifica el factor de transcripción forkhead-box-03, también conocido como *FKHRL1* está localizado en el cromosoma 6. Participa en múltiples vías celulares que regular la proliferación, resistencia al estrés oxidativo, metabolismo, diferenciación celular, inflamación, envejecimiento y apoptosis (77, 145). Este gen presenta varios SNPs, eligiendo dos y determinando su genotipado mediante RT-PCR a tiempo real. El cambio de nucleótido para el SNP *rs2764264* es una T por una C en la posición 6:108934461. El cambio de nucleótido para el SNP *rs2802292* es una T por una G en la posición 6:108908518.

- *FOXO-3 (rs2764264)*:

TACCAGGGTAATGGTGGTCTTATAA[T/C]ATGAGTTGGAAAGTGTTCCCTGTTC

- *FOXO-3 (rs2802292)*:

TGCTCACAAGAGCTCAGGGCTGGGA[T/G]AAGCCTCTGTGTGACAGATGAAGGG

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando *SPSS® versión 24.0 (IBM, Chicago, Illinois, EE. UU.)* y *R versión 3.3.0*. Todas las variables se analizaron para determinar la normalidad de distribución mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se normalizaron cuando era necesario mediante la transformación logarítmica (\log_{10}). Los datos se presentan como la media \pm error estándar. Las variables continuas se compararon utilizando la “t” de Student y el análisis de varianza (ANOVA) dependiendo de la existencia de dos o más grupos en cada comparación. Cuando estas variables no siguieron una distribución normal, se utilizó la transformación requerida de los datos para el análisis. Las variables categóricas se compararon mediante la prueba de Chi-

cuadrado. Definimos la presencia de senescencia biológica en aquellos pacientes con valores de RTL en el quintil inferior ($RTL \leq 0,7629$).

La regresión logística se utilizó para calcular los coeficientes beta para aquellas variables que pueden predecir el riesgo de senescencia biológica. Definiendo como variable dependiente la presencia de senescencia biológica, e incluyendo como covariables del modelo de regresión, las variables definidas a continuación. Creamos tres modelos basados en la evidencia previa (146, 147):

1) un modelo basal (edad, género, índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, frecuencia cardiaca, colesterol HDL, triglicéridos en ayunas, PCR-us y HOMA-IR).

2) un modelo extendido (modelo basal + tG + GSH + GSSG + Ratio GSH/GSSG + GPx + catalasa + SOD + PC + NOx + LPO + MCP-1 + TNF- α + adiponectina + IL-1 β + IL6 + resistina + leptina).

3) un modelo reducido (incluimos todas las variables del modelo basal más aquellas variables que permanecieron en el último paso del modelo extendido: catalasa, SOD, LPO, IL-1 β , resistina).

Posteriormente, se trazaron las curvas ROC calculadas para cada modelo. Evaluamos la capacidad de predicción del modelo para discriminar a las personas con senescencia biológica de las no senescentes, utilizando el área bajo la curva (AUC) de las diferentes curvas ROC de cada modelo. Para la validación interna del modelo, se estimó el grado de sobre-optimismo resultante de la evaluación del modelo sobre los mismos datos en los que se desarrolló, utilizando técnicas de remuestreo aleatorio (bootstrap) del conjunto original (1000 muestras aleatorias), según método descrito por Collins GS et al. (148).

Finalmente, completamos nuestro análisis incluyendo a los modelos calculados la información aportada por los polimorfismos del gen FOXO3 (*rs2764264* y *rs2802292*) como posibles variables predictoras del riesgo de senescencia biológica, denominado

modelo genético. Las distribuciones de los genotipos no se desviaron de las expectativas de Hardy-Weinberg ($p > 0,5$). Debido a las bajas frecuencias genotípicas de los individuos homocigotos para los alelos menores, analizamos los SNPs utilizando dos categorías de genotipos en un modelo dominante. El desequilibrio de ligamento involucra a dos SNPs en el mismo cromosoma y favorece que estos no se segreguen de forma independiente, disminuyendo la probabilidad de recombinación. Cuando esta asociación ocurre, solo es necesario genotipar uno de estos SNP. Los desequilibrios de ligamento se estimaron utilizando el programa *LINKAGE* (versión 5.1; [http://linkage.rockefeller.edu/soft/list2.html# 1](http://linkage.rockefeller.edu/soft/list2.html#1)), permitiéndonos calcular los coeficientes D' y R^2 . Para el cálculo del modelo genético, se definió nuevamente como variable dependiente la presencia de senescencia biológica, y como covariables del modelo de regresión aquellas incluidas en el modelo reducido asociando la variable del polimorfismo (*rs2802292*). A continuación, trazamos la curva ROC y utilizamos AUC para evaluar la capacidad de predicción de este último modelo.

9. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para la obtención bibliográfica se usó 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. Se empleó a su vez el proveedor de información *Ovid Technologies* al que se accede a través del *Ovid Web Gateway*. Se accedió a estas plataformas junto con la consulta directa de determinadas revistas científicas a través de la *Biblioteca Virtual del Servicio de Salud Público de Andalucía* (<http://www.bvsspa.es/profesionales/>).

Las referencias se muestran según el estilo *Vancouver* para la publicación de manuscritos en el ámbito de las Ciencias de la Salud.

VI. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO CORDIOPREV.

Como se ha descrito previamente en el apartado de diseño y metodología, en el estudio CORDIOPREV participaban 1002 pacientes, con edades comprendidas entre los 20 y los 75 años y con un evento coronario de más de 6 meses de evolución respecto a la fecha de inclusión en el estudio, aleatorizados 502 a una dieta mediterránea y 500 a una dieta baja en grasa. Al inicio del estudio no hubo diferencias significativas entre ambos grupos de intervención (137).

2.- CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN NUESTRO SUBESTUDIO.

Para realizar nuestro análisis, de todos los pacientes se seleccionaron aquellos que cumplieran ≥ 4 criterios de SMet y disponíamos de todas las variables clínicas, antropométricas, biomarcadores y longitud de telómeros, 353 pacientes del total incluido en el estudio. Las características basales del subgrupo de pacientes incluidos en nuestro análisis se muestran en la **Tabla 3**.

La senescencia biológica la definimos como la presencia de acortamiento de los telómeros en función de los valores más bajos de RTL determinados en nuestra población. La clasificación en quintiles nos permite graduar nuestra cohorte según el grado de acortamiento de los telómeros, seleccionando aquellos pacientes con RTL más extremos y permitiéndonos establecer una comparación entre los dos grupos definidos. Aclaramos que el concepto de senescencia biológica como equivalente a presentar senescencia celular.

Se objetivaron diferencias significativas entre ambos grupos (senescencia biológica versus no senescencia biológica) ($p < 0,05$), con niveles más altos para los valores de catalasa, SOD, IL-1 β , resistina y leptina en el grupo de senescencia biológica

respecto al no-senescente. Los niveles de colesterol total fueron más bajos en el grupo de senescencia biológica.

Tabla 3. Características basales de nuestra población.

	No-Senesencia Biológica	Senescencia Biológica	Valor de P
N	279	74	
Edad (años)	58,6 ± 8,5	60,2 ± 8,2	0,13
IMC (kg/m²)	31 ± 4	31 ± 5	0,54
Perímetro cintura (cm)	104,9 ± 11,8	107,2 ± 12	0,13
TAs (mmHg)	139 ± 21	139 ± 22	0,97
TAd (mmHg)	78 ± 11	79 ± 10	0,48
HbA1c (%)	6,5 ± 1,1	6,6 ± 1,1	0,75
Filtrado glomerular (ml/min)	94 ± 20	92 ± 23	0,34
Colesterol Total (mg/dL)	160 ± 32	151 ± 29	0,034*
c-HDL (mg/dL)	43 ± 10	41 ± 9	0,94
Triglicéridos (mg/dL)	133 ± 69	131 ± 66	0,78
c-LDL (mg/dL)	89 ± 26	83 ± 23	0,053
PCR-us (mg/dL)	3,1 ± 3,9	2,6 ± 2,9	0,37
HOMA-IR	3,5 ± 5,9	3,9 ± 5,8	0,6
Glutación Total (mM/mg.Hb) x10⁻³	12,3 ± 1,5	12,5 ± 1,5	0,48
Glutación reducido (GSH) (mM/mg.Hb) x10⁻³	10,7 ± 2,3	10,6 ± 2,3	0,87
Glutation oxidado (GSSG) (mM/mg.Hb)	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,002	0,31
Ratio GSH/GSSG (%)	15,4 ± 21,1	15,1 ± 19	0,91
Glutation peroxidado (GPx) (U/mg.Hb) x10⁻³	33,9 ± 23,5	31,6 ± 17,8	0,42
Catalasa (U.Activity/mg.Hb) x10⁻³	3,53 ± 2,1	4,18 ± 2,9	0,034*
Superóxido dismutasa (SOD) (U.Activity/mg.Hb)	2,4 ± 1	2,6 ± 1,1	0,049*
Proteínas carboniladas(Pc) (nM/ml)	0,032 ± 0,01	0,031 ± 0,008	0,34
Óxido nítrico (NOx) (uM/L)	47,1 ± 16,7	46,6 ± 19	0,83
Productos de peroxidación lipídica (LPO) (uM/L)	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,5	0,58
MCP1 (pg/mL)	211,1 ± 106,5	217,1 ± 114,9	0,67
TNF-α (pg/mL)	12,8 ± 5,9	12,9 ± 7,2	0,92
IL-6 (pg/mL)	6,8 ± 4,1	6,7 ± 3,8	0,89
IL-1β (pg/mL)	1,2 ± 0,6	1,4 ± 1,3	0,033*
Adiponectina (ug/mL)	6,7 ± 4,3	6,5 ± 4,5	0,76
Resistina (ng/mL)	7,4 ± 3,7	8,7 ± 4	0,007*
Leptina (ng/mL)	19,3 ± 11,8	22,9 ± 14,4	0,029*

Tipo de residencia (2 grupos)%	61.5/38.5	59/41	0,68
Nivel educativo (4 grupos)%	8/22/52/18	8/22/56/14	0,87
Ingresos mensuales (3 grupos)%	19/49/32	16,5/60/23,5	0,20
Tiempo de actividad física (metros.min. día)	204,79±13,383	185,97±22,342	0,50

Abreviaturas: IMC: índice de masa corporal, TAs: tensión arterial sistólica, TAd: tensión arterial diastólica, c-LDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad, c-HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad, HbA1c: hemoglobina glicada, HOMA-IR: índice de resistencia a la insulina, PCR-us: Proteína C reactiva de alta-sensibilidad, IL-6: interleuquina 6; IL-1 β : interleuquina 1 beta, TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa, MPC-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1.

Tipo de residencia 2 grupos: rural/urbano; nivel educativo 4 grupos: educación universitaria/educación secundaria/educación primaria/ninguna; Ingresos mensuales (euros/mes) 3 grupos: >1.800/ 900-1.800/< 900.

Los valores están expresados como la media \pm error estándar o porcentaje. Test de Student. ANOVA. Chi-cuadrado.

* $p < 0,05$.

Para completar el análisis de las características de nuestra población a estudio, se realizó una comparativa de los fármacos utilizados en el manejo de pacientes con enfermedad cardiovascular en ambos grupos (senescencia biológica vs no senescencia biológica), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en ninguno de ellos. Los resultados los mostramos en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Comparativa de fármacos entre subgrupos.

Fármacos	No-Senescencia Biológica	Senescencia Biológica	Valor de P
Betabloqueantes	78,9%	80,6%	0,70
IECA	53,8%	54,2%	0,37
ARA II	25,1%	26,4%	0,12
Diuréticos	34,8%	29,2%	0,37
Antagonistas del calcio	18,6%	22,2%	0,48
Hipolipemiantes	91,4%	87,5%	0,27
Fibratos	2,9%	2,7%	0,94

Abreviaturas: IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina. ARA II: antagonistas de los receptores de angiotensina II.

Los valores están expresados en porcentajes. Chi-cuadrado.

* $p < 0,05$.

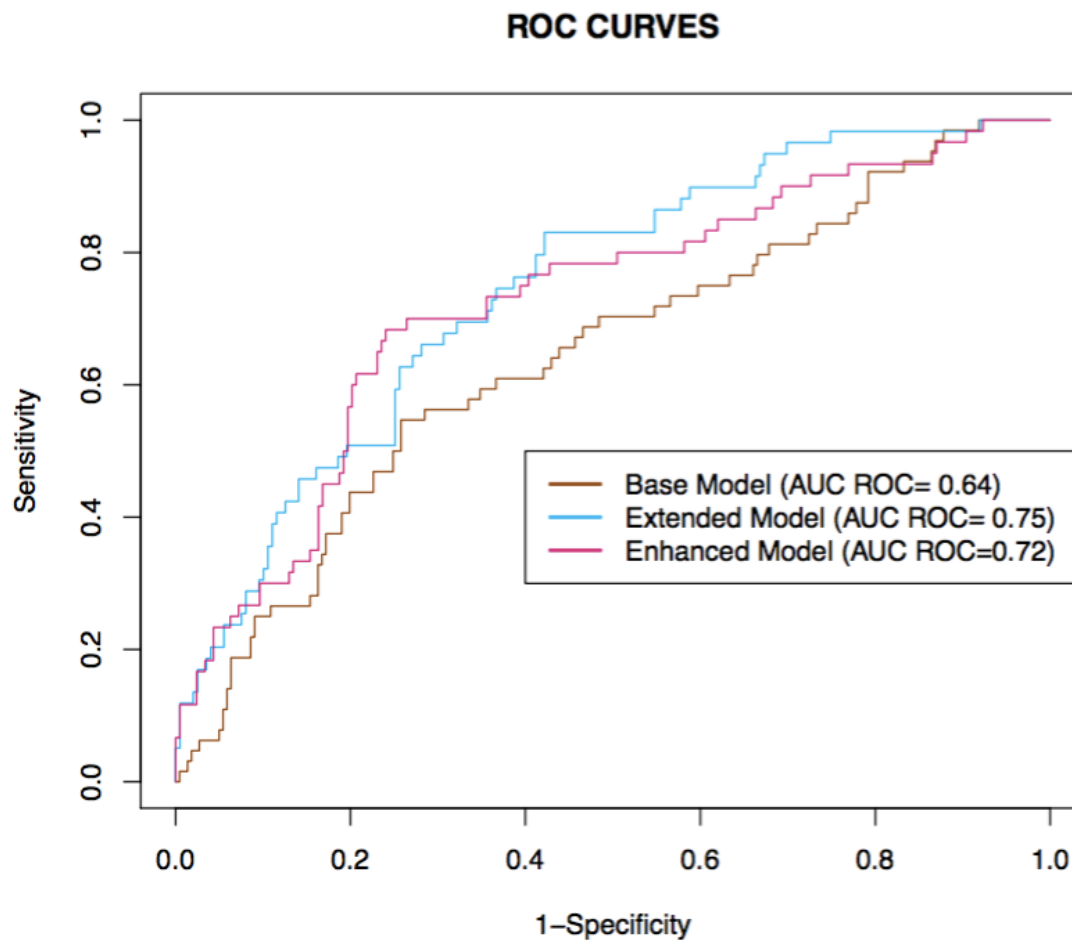
3. FACTORES PREDICTORES DE RIESGO BIOLÓGICO DE SENESCENCIA.

Al inicio del estudio 74 pacientes, un 20% de nuestra población, tenía senescencia biológica, según los criterios definidos en función del valor de RTL en el quintil inferior ($RTL \leq 0,7629$).

La **Figura 8** representa los predictores de diagnóstico de senescencia biológica en los diferentes modelos y su área bajo la curva (AUC) de las diferentes curvas ROC de cada modelo (149). En base a esos resultados, seleccionamos el modelo reducido como aquel con más eficiencia.

Por lo tanto, el riesgo de senescencia biológica se puede calcular como $P = 1 / (1 + e^{(-\beta X - 5,3970)})$, donde β es el coeficiente de regresión y X es el nivel para cada factor de riesgo. El punto de corte con mejor sensibilidad ($S = 0,7$) y especificidad ($E = 0,74$) fue 0,233.

Figura 8. Curva ROC de los modelos predictivos. Predictores de diagnóstico de senescencia biológica en los diferentes modelos y su área bajo la curva ROC.



4. VALIDACIÓN INTERNA.

El remuestreo del conjunto original (1.000 muestras aleatorias) mostró un grado de optimismo de 0,08 para el modelo reducido, que representa la desviación de la media del error estándar de la estimación en estas 1.000 muestras. Estos resultados los representamos en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Resumen de la validación interna tras el remuestreo bootstrap del conjunto original.

Modelo	Apparent 'in-sample' AUC	Optimismo	Bootstrapped AUC
Basal	0,6442308	0,07926560	0,5649652
Extendido	0,7469551	0,13848944	0,6084657
Reducido	0,7249199	0,08595089	0,6389690

Abreviaturas: AUC área bajo la curva.

5. EFECTO DE LOS SNPs DEL GEN FOXO3 COMO PREDICTOR DEL RIESGO DE SENESCENCIA BIOLÓGICA.

5.1 Distribución y frecuencia de los SNPs del gen FOXO3.

Para analizar la frecuencia y la distribución de un SNP es importante saber si dicha frecuencia y su distribución es similar en otras poblaciones en las que se haya analizado, de esta forma se eliminan diferencias étnicas que puedan intervenir en nuestros resultados. Dentro de nuestro subanálisis se determinó la frecuencia de los genotipos C/C, C/T y T/T para el SNP *rs2764264*, y los genotipos G/G, G/T y T/T para el SNP *rs2802292*, todos en el gen FOXO3. Los datos de nuestros pacientes para estos genotipos fueron comparados con los esperados siguiendo el principio Hardy-Weinberg que se utilizó para calcular los valores de X^2 tal y como se refleja en la **Tabla 6**. Por otro lado, también se analizaron las frecuencias alélicas de ambos SNPs, representados en la **Tabla 7**. El análisis de desequilibrio de ligamiento mostro que los SNPs del gen FOXO3 (*rs2764264* y *rs2802292*) estaban en desequilibrio de ligamiento, con $D' = 0,98$ y $R^2 = 0,79$ centrando nuestros resultados en SNPs *rs2802292*.

Tabla 6. Equilibrio de Hardy Weinberg para los SNPs del gen FOXO3.

	GENOTIPOS	HW-OBS	HW-ESP	H-W (P)
<i>rs2764264</i>	C/C	40	39	0,81
	C/T	149	151	
	T/T	147	146	
<i>rs2802292</i>	G/G	55	55,9	0,84
	G/T	164	162,3	
	T/T	117	117,9	

HW-ESP: Hardy-Weinberg esperada; HW-OBS: Hardy-Weinberg observada. *Valores de P: significación estadística ($P < 0,05$) expresados mediante Chi-cuadrado.

Tabla 7. Frecuencias alélicas de los SNPs del gen FOXO3.

<i>rs2764264</i>	FRECUENCIA ALÉLICA	<i>rs2802292</i>	FRECUENCIA ALÉLICA
C	0,34	G	0,4
T	0,66	T	0,6

5.2 Evaluación de los SNPs *rs2764264* y *rs2802292*.

Para el análisis de los dos SNPs del gen FOXO3 los pacientes fueron agrupados en dos grupos en función del alelo que presentasen. Por un lado, se constituyó un grupo con los individuos homocigotos para el alelo mayoritario y, en contraposición, el segundo grupo se formó agrupando a los individuos portadores del alelo minoritario (heterocigotos y homocigotos para el alelo minoritario). Para los dos SNPs analizados (*rs2764264* y *rs2802292*) no se encontraron asociaciones significativas con la RTL de ambos subgrupos, tal y como se refleja en la **Tabla 8**.

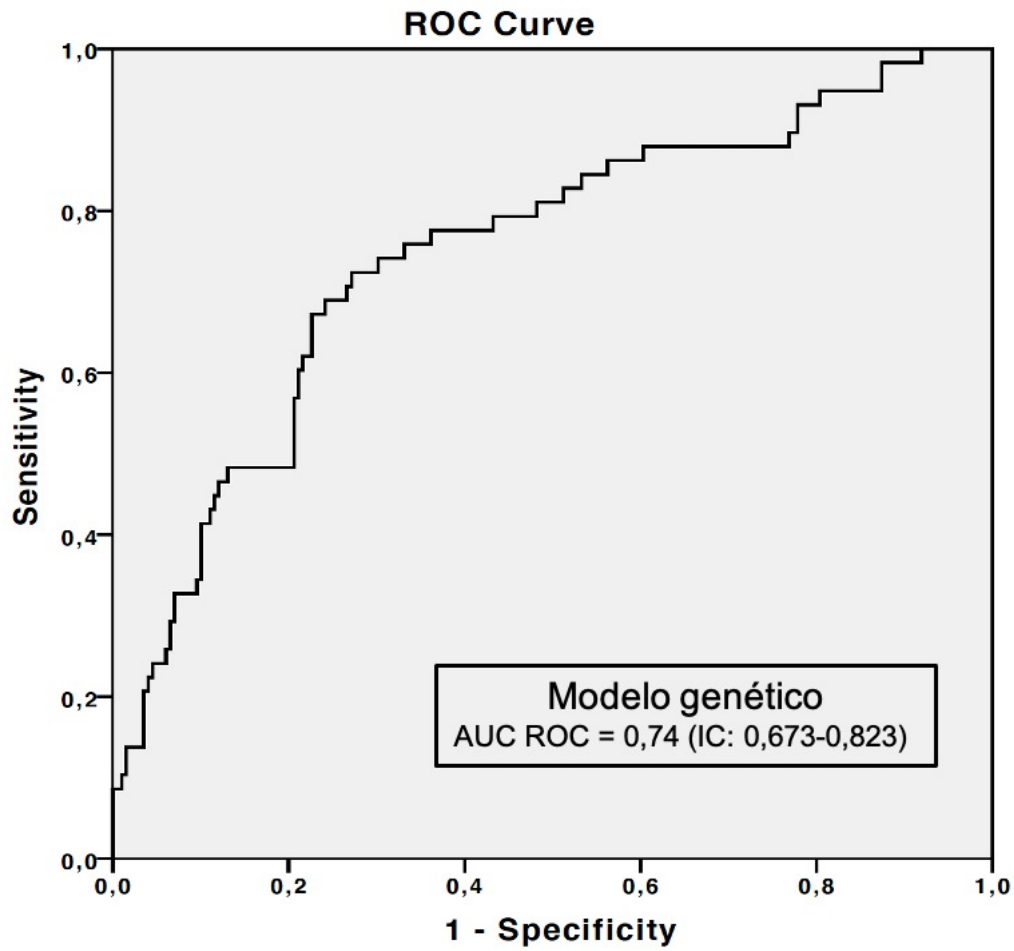
Tabla 8. Comparativa de frecuencias alélicas entre subgrupos.

	Genotipos	No-Senescencia Biológica	Senescencia Biológica	Valor de P
<i>rs2764264</i>	T/T	45,2%	38,8%	0,33
	C/T y C/C	54,7%	61,1%	
<i>rs2802292</i>	T/T	37,3%	25,3%	0,06
	G/T y G/G	62,6%	74,6%	

Los valores están expresados en porcentajes. Chi-cuadrado.
* $p < 0,05$.

La **Figura 9** representa la curva ROC resultante del modelo de predicción de senescencia biológica que incluye la información genética aportada por el *rs2802292* al modelo reducido (incluyendo edad, género, índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, frecuencia cardíaca, colesterol HDL, triglicéridos en ayunas, PCR-us, HOMA-IR, catalasa, SOD, LPO, IL-1 β y resistina) y su área bajo la curva ROC. Comparado con los valores del modelo reducido, la adición la información genética de dicho polimorfismo, aporta una discreta mejoría en el área bajo la curva ROC (AUC modelo genético = 0.74 vs AUC modelo reducido = 0.72).

Figura 9. Curva ROC del modelo genético (modelo reducido + rs2802292) y su índice de área bajo la curva ROC.



VII. DISCUSIÓN

Nuestro estudio ha identificado diferentes modelos predictivos que nos permiten graduar el grado de senescencia biológica en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida, pudiendo de esta forma identificar un subgrupo de pacientes con mayor riesgo y que pueden requerir un manejo y tratamiento más exhaustivo. Para construir estos modelos hemos utilizado la información de diferentes biomarcadores de riesgo de enfermedad cardiovascular, respuesta inflamatoria y estrés oxidativo, junto con diferentes variantes genéticas que se han relacionado con el envejecimiento. Dichos modelos se han diseñado con el objetivo de proporcionar diferentes enfoques. De todos ellos, el modelo reducido, que incluye edad, género, índice de masa corporal, perímetro de cintura, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, frecuencia cardíaca, c-HDL, triglicéridos en ayunas, PCR-us, HOMA-IR, catalasa, SOD, LPO, IL-1 β y resistina como variables independientes, sería el más rentable para determinar el grado de senescencia biológica, tal y como se deriva de nuestros resultados.

Como ya hemos comentado previamente, algo que caracteriza a la medicina actual es su intento por personalizar el manejo diagnóstico y terapéutico de cada paciente, permitiendo que nuestra actuación médica sea más eficiente. Tanto los programas científicos de Horizonte Europa como el propio Instituto de Salud Carlos III nos invitan a trabajar en esta dirección. Los avances en investigación en los últimos años junto con la tecnología que surge tras la secuenciación del genoma generan un abanico de posibilidades técnicas que, asociado a la aplicación de la genómica, la epigenética, la metabolómica o la bioinformática, permite el desarrollo de la Medicina Personalizada y de Precisión. Al mismo tiempo, nos encontramos con un aumento progresivo de la esperanza de vida en los países industrializados, que incrementa la comorbilidad asociada al envejecimiento. En este contexto, el disponer de nuevas herramientas con diferentes enfoques que nos ayuden a estratificar el riesgo de los pacientes con enfermedad cardiovascular, identificando a los que presenta un mayor riesgo, y de esta forma poder modificar las pautas de manejo y tratamiento en estos casos, supone un avance hacia la individualización en la medicina. Por este motivo,

nuestro estudio pretende contribuir al avance de la Medicina de Precisión, utilizando estos modelos predictivos como herramientas que permitan estratificar el grado de senescencia de nuestros pacientes con alto riesgo cardiovascular, y de esta forma optimizar su manejo posterior.

El aumento de la esperanza de vida está asociado al aumento de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento, siendo una de las principales las enfermedades cardiovasculares (150). La edad es el factor de riesgo no modificable más importante en el desarrollo de la patología cardiovascular (8). Por otro lado, la esperanza de vida de las personas con diferentes factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia) se ve reducida frente a la población general, al igual que la calidad de vida; generando un mayor coste sanitario (151, 152).

Estudios previos han demostrado que el acortamiento de LTL se asoció con la enfermedad cardiovascular (50, 153, 154), y con el incremento en el riesgo de mortalidad por eventos isquémicos (155-157). En un estudio de prevención primaria realizado en Escocia, e incluyendo pacientes con enfermedad coronaria en comparación con individuos sanos, se observó que las personas con LTL más corto tenían un mayor riesgo de desarrollar enfermedad coronaria comparado con las personas con LTL más largos; este aumento se atenuó cuando los pacientes recibían tratamiento con estatinas (158). Los datos del estudio de cohortes prospectivo *Heart and Soul*, realizado en 780 pacientes con enfermedad coronaria estable de la ciudad de San Francisco, mostraron que un acortamiento de LTL se asoció con un aumento de la mortalidad, independientemente de la edad cronológica, los factores clínicos, la PCR o las variables ecocardiográficas, no pudiendo explicar esta asociación solo por los marcadores de riesgo cardiovascular clásicos (159). Además, un estudio observacional a gran escala realizado en Dinamarca (160), que incluyó a más de ochenta mil pacientes con cardiopatía isquémica, con datos recogidos de diferentes estudios realizados en población danesa y complementados con datos del consorcio *CARDIoGRAM* (161,

162), estableció que el acortamiento en la longitud de los telómeros era un factor de riesgo para la enfermedad coronaria. En resumen, los múltiples estudios realizados hasta la fecha sugieren que la enfermedad cardiovascular se asocia con el acortamiento de LTL, y por lo tanto podría considerarse un marcador de senescencia celular. La posibilidad de poder saber de forma indirecta si un paciente con patología cardiovascular es además biológicamente senescente, nos indicaría la necesidad de modificar el manejo clínico e intensificar el control de los demás factores de riesgo asociados que presente. Al mismo tiempo, podríamos realizar cambios en las pautas de tratamiento encaminadas a intentar mejorar el manejo y el pronóstico de la enfermedad cardiovascular.

La arteriosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, producida por el desarrollo de placas de ateroma en la íntima de las arterias. Al someter a las células endoteliales arteriales a determinados estímulos lesivos como la hipertensión, dislipemia, tabaco o mediadores inflamatorios, se altera la permeabilidad endotelial permitiendo la entrada de partículas c-LDL, que favorecen la adhesión de leucocitos y monocitos, fagocitando estos las partículas de lipoproteínas y convirtiéndose en células espumosas, generando la de placa de ateroma (96).

La arterioesclerosis y la enfermedad cardiovascular son la principal causa de morbimortalidad en países industrializados, asociado a un alto coste económico, social y humano. Cada día es más importante realizar una detección precoz de la fase de aterosclerosis subclínica que permita prevenir la progresión de esta patología. Para mejorar el diagnóstico es necesario complementar los puntajes clásicos de riesgo de enfermedad cardiovascular y asociar nuevos biomarcadores que puedan indicar su desarrollo durante las primeras etapas de la enfermedad. Estudios previos también han demostrado la asociación entre el acortamiento de los LTL y la arterioesclerosis (55, 163-165). En un estudio prospectivo que incluía a 768 participantes del estudio *PLIC* (166, 167), voluntarios en los que se evalúa la progresión de lesiones carotídeas, determinando el grosor de la íntima media de la arteria carótida común y relacionándolo

con LTL, en tiempo basal y a los 6 años, mostró una relación inversa entre ambos, independientemente de los factores clásicos de riesgo cardiovascular (168). Un subanálisis del estudio prospectivo epidemiológico Bruneck (169), realizado en personas de 40 a 80 años, elegidos al azar en la zona del Tirol, al norte de Italia, cuyo objetivo era evaluar la epidemiología, fisiopatología y prevención de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares; este subanálisis incluyó a 800 participantes y demostró una asociación entre el acortamiento de LTL y la aterogénesis avanzada, independientemente de los factores de riesgo estándar; sin embargo, no ocurrió con la valoración de la aterogénesis temprana (170). Resultados similares respecto a la aterogénesis temprana se obtuvieron en un subanálisis del estudio transversal *PESA* realizado en España (entre 2010 y 2014), en trabajadores de la banca, asintomáticos y sin enfermedad cardiovascular establecida, cuyo objetivo era valorar la relación de la arteriosclerosis subclínica con el acortamiento LTL (171).

Un elevado grupo de personas desarrollan un estado proinflamatorio crónico leve asociado al envejecimiento (172), el cual se convierte en un factor de riesgo para el desarrollo de comorbilidad. En nuestra población, los pacientes con senescencia biológica mostraron niveles más elevados de determinados parámetros inflamatorios como IL-1 β , resistina y leptina. En el estudio longitudinal *InCHIANTI*, con más de mil participantes, con edad superior a 60 años, seguidos durante 9 años, se observó un aumento de morbilidad en pacientes de edad avanzada y con niveles altos de IL-6 (173). La relación que observamos ha hecho que hablemos del concepto “envejecimiento inflamatorio”, definido como la situación en la que se produce una elevación de biomarcadores inflamatorios (PCR, interleucinas, TNF- α) y favorece el desarrollo de patologías crónicas (174). Paralelamente, es conocida la relación que existe entre IL-1 β e IL-6 con el acortamiento de LTL (175). En el estudio “*The Health, Aging and Body Composition*” realizado en EE. UU. con 1.962 voluntarios de 70 a 79 años, independientes y con vida activa, se analizó la relación entre parámetros inflamatorios

y LTL. Los resultados de la regresión logística indicaron que los participantes con niveles elevados de IL-6 y TNF- α tenían más probabilidad de presentar acortamiento telomérico (176). En un subanálisis del estudio longitudinal “*The Harvard Boilermakers*” (177), donde incluyeron 87 de los 190 participantes, mayores de 18 años, pertenecientes al sindicato de soldadores, y cuyo objetivo fue analizar la longitud de LTL y su relación con la concentración de biomarcadores de inflamación medidos de forma repetida durante los dos años de seguimiento, tras realizar modelos de regresión lineales encontraron asociaciones significativas de LTL corto con niveles elevados PCR-us. Sin embargo, en ese estudio no se encontró relación significativa con las interleucinas; según los investigadores puede ser debido al número de participantes o la baja variabilidad en las concentraciones plasmáticas de estos biomarcadores. Nuestro análisis muestra un nivel de IL-1 β significativamente elevado en el grupo de pacientes senescentes, lo cual corrobora los resultados de los estudios previamente mencionados. La IL-1 β es una citoquina proinflamatoria y con carácter proaterogénico que induce disfunción en el endotelio vascular, aumentando la producción de moléculas de adhesión y el reclutamiento de los leucocitos y monocitos, implicados en el proceso de aterogénesis (178). Por lo tanto, los pacientes con RTL más corto presentan un mayor estado inflamatorio, que se asocia con diversas patologías crónicas entre las que se encuentra la enfermedad coronaria. Sería interesante analizar en el futuro, dentro del estudio CORDIOPREV, los datos de incidencia de nuevos eventos o mortalidad cardiovascular en nuestra población, permitiendo conocer la frecuencia de recidivas en cada subgrupo y la relación con RLT.

La obesidad central es otro factor de riesgo para múltiples patologías cardiovasculares, entre las que se incluye la enfermedad coronaria (179). Los pacientes con obesidad se caracterizan por un aumento del estrés oxidativo y una inflamación sistémica de bajo grado (180, 181). Por otro lado, existe una relación inversa entre la obesidad y la LTL, al analizar una muestra transversal del estudio longitudinal de *Fels*,

donde se incluían 309 participantes, cuyo objetivo era valorar la relación de los telómeros con la adiposidad, y en el que se demostró que el IMC, el perímetro de cintura, la grasa corporal total y el volumen del tejido adiposo visceral estaban directamente relacionados con un acortamiento de LTL, independientemente de otros factores de riesgo cardiovascular (182). En nuestro estudio, no se hallaron diferencias entre ambos grupos en los valores del IMC y del perímetro de cintura, lo que podría estar justificado por las características basales de nuestra subpoblación, en la cual los pacientes cumplían ≥ 4 criterios de SMet.

La leptina es una hormona producida principalmente por los adipocitos, siendo una de sus funciones la regulación del equilibrio energético al disminuir la ingesta de alimentos y aumentar el gasto calórico (183). Actúa a nivel del sistema nervioso central inhibiendo neuropéptidos orexígenos y estimulando anorexígenos, realizándose diversos estudios al ser considerada una opción para el tratamiento de la obesidad. Sin embargo, en estudios anteriores se ha observado que la leptina está elevada en pacientes con determinados tipos de obesidad. En estudios experimentales se concluye que es debido a una resistencia de su receptor, produciendo una disminución de la sensibilidad a esta hormona (184). Por otro lado, la leptina se considera un mediador de respuesta inflamatoria, estando elevada en patologías crónicas como son la obesidad y la aterosclerosis (185). En nuestro análisis encontramos niveles más elevados de leptina en el subgrupo con senescencia biológica, corroborando datos similares en un análisis de siete cohortes independientes con un total de 11.448 participantes, pertenecientes al consorcio *ENGAGE*, donde se evaluó la relación entre la longitud de los telómeros con niveles de leptina y adiponectina, concluyendo que los niveles elevados de leptina se asociaron con un LTL corto (186). Los autores indican que la relación entre LTL y la leptina, y a su vez el de esta última con la patología cardiovascular, podría permitir usar LTL como biomarcador para enfermedad cardiovascular.

La resistina es una adipocina proinflamatoria, inicialmente relacionada con la resistencia a la insulina. Sin embargo, su mecanismo de acción es desconocido en

humanos debido a que no se ha determinado un receptor específico de acción. Los estudios experimentales sugieren que la resistina tiene un papel potencial en el eje hipotálamo-hipofisario y que participa en los órganos reproductivos y la placenta (187). En humanos parece que participa como modulador del sistema inflamatorio promoviendo la liberación de biomarcadores proinflamatorios por los macrófagos, como PCR, interleucinas y TNF- α , junto con la expresión de moléculas de adhesión vascular como son VCAM, ICAM o MPC-1 (188). Al mismo tiempo, la resistina induce la proliferación de células musculares lisas en las paredes arteriales, aumentando la resistencia y generando un aumento del estrés oxidativo al reducir la disponibilidad de NO (189), causando una disfunción endotelial. Todo esto contribuye a favorecer la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular (190).

En nuestro análisis se observan niveles significativamente más elevados de resistina en el grupo con senescencia biológica. Este resultado, junto con los niveles más elevados de IL-1 β y leptina, todos definidos como biomarcadores inflamatorios, nos indica que los pacientes envejecidos tienen un mayor estado proinflamatorio crónico. Identificándolos precozmente podremos modificar hábitos e intensificar tratamientos, consiguiendo mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes coronarios.

El perímetro de cintura se considera uno de los mejores predictores de salud cardiometabólica. En un estudio transversal sobre nutrigenómica y salud realizado en Toronto, que incluía 1.181 voluntarios sanos se comparó el IMC y el perímetro de cintura para definir el mejor predictor de las concentraciones lipídicas en sangre, tras el análisis se concluyó que el perímetro de cintura era el mejor predictor de patología cardiovascular (191). Son múltiples los estudios previos que han descrito un acortamiento de LTL en pacientes con un mayor perímetro de cintura (182, 192, 193). Uno de los más recientes es un estudio transversal que se realizó en 497 sujetos libaneses cuyo objetivo era evaluar la relación de LTL con características demográficas, hábitos de vida y diversas patologías. De todos los parámetros fue el perímetro de cintura el que se asoció de manera más significativa con el acortamiento de LTL (194).

Sin embargo, en nuestro análisis no observamos asociaciones estadísticamente significativas, posiblemente por las características de los pacientes incluidos en el estudio, donde la proporción de obesos en ambos grupos es elevada.

La evidencia epidemiológica demuestra que las lipoproteínas de baja densidad están relacionadas con el riesgo de enfermedad cardiovascular (195). Sin embargo, existen pocos estudios que analicen específicamente la relación de estos parámetros con la longitud de los telómeros. En 2019, se publicó un análisis de 6.468 participantes pertenecientes a la base de datos NHANES, cuyo objetivo principal fue valorar la correlación de lipoproteínas con la longitud de los telómeros. No se encontró asociación con c-LDL o TG después de ajustar los datos demográficos, dietéticos, examen físico y comorbilidades. Solo se asoció positivamente con c-HDL cuando la longitud de los telómeros era inferior a 1,25 (196). En nuestro análisis encontramos niveles de colesterol total significativamente más elevados en el grupo no senescente respecto al grupo senescente, aunque sin ser clínicamente relevantes. No se objetivaron diferencias en los niveles de c-LDL ni c-HDL.

Por otro lado, los pacientes identificados en el subgrupo de envejecimiento biológico se asociaron a niveles más elevados de biomarcadores de estrés oxidativo, como son la actividad SOD y la catalasa.

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante del organismo (197). En esta situación, las células liberan enzimas antioxidantes, como SOD, catalasa y GPx, como primera línea de defensa para la desintoxicación de los radicales libres resultantes del estrés oxidativo producidos por el metabolismo (108, 198). En este sentido, nuestro grupo de investigación realizó un análisis de un subgrupo de pacientes del estudio *LIPGENE* (199), formado por 88 participantes con dos o más criterios de ATP III-NCEP para SMet (200). El objetivo principal fue determinar la posible relación entre la disfunción endotelial y la longitud de LTL, a través de parámetros de estrés oxidativo. Los resultados mostraron que pacientes con LTL tienen un mayor grado de estrés oxidativo,

lo que conduce a una mayor actividad plasmática de las enzimas antioxidantes (GPx y SOD), biomarcadores de estrés oxidativo (PC y F2-isoprostanos) y disminución de niveles de NO. Resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado en 57 pacientes con enfermedad cardiovascular clasificados en dos grupos según la presencia o no de SMet y comparados con 21 pacientes control (201); se analizó la relación entre el acortamiento de LTL y el estrés oxidativo, encontrando una correlación negativa entre ambos junto con niveles mayores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedad cardiovascular y SMet. En nuestro análisis encontramos que el grupo de pacientes con la LTL más corta presenta una mayor actividad plasmática de enzimas antioxidantes siendo los niveles de catalasa y SOD superiores en este grupo; esto puede deberse a una respuesta celular a la disfunción endotelial que presentan estos pacientes, induciendo una mayor activación del sistema de reparación del daño oxidativo, intentando restaurar el equilibrio celular.

Por último, la interacción entre genes y medio ambiente modula nuestro estado de salud, de modo que la respuesta celular a diferentes señales ambientales está mediada por cascadas de señalización junto a determinadas variantes génicas que regulan la plasticidad de la cromatina, pudiendo promover la interacción de promotores con elementos reguladores y formar centros de cromatina activos (202). Decidimos analizar la relación del envejecimiento biológico y determinados polimorfismos del gen FOXO3, conocido por mostrar una asociación genética con la longevidad humana (203, 204), siendo el SNP *rs2802292* el que presenta una asociación más robusta (202, 205, 206). Se sabe que la frecuencia del alelo G de FOXO3 es más del doble entre personas 70 a 100 años convirtiéndose en el alelo principal de la población muy longeva (204). La relación de los alelos del gen FOXO3 y la dinámica de los telómeros en función de la edad se evaluó en un estudio realizado en 121 sujetos japoneses con edades comprendidas entre los 21 y los 95 años (203). Los resultados muestran que los participantes menores de 50 años portadores del alelo mayoritario T (T/T) tenían LTL mayor que los portadores del alelo minoritario G (G/T o G/G). Por otro lado, los mayores

de 85 años portadores del alelo minoritario G presentaban una LTL mayor. Sin embargo, los autores concluyen la falta de correlación entre la edad y LTL en los participantes portadores del alelo minoritario G. En nuestra población no encontramos diferencias significativas en las frecuencias alélicas de ambos grupos en relación con RTL. No obstante, es interesante mencionar que la edad media de nuestros pacientes es superior a 50 años, obteniendo resultados similares a los del estudio japonés anteriormente mencionado. Por tanto, otros factores pueden ser responsables de la capacidad de FOXO3 para mantener la longitud de los telómeros hasta la vejez, necesitando estudios futuros para dilucidar la base celular y molecular del proceso de interacción de este gen con LTL.

En la actualidad, se han desarrollado y publicado múltiples modelos para evaluar a los pacientes y poder predecir el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Estas herramientas permiten clasificar a los pacientes en diferentes niveles y modificar las estrategias de manejo y terapéuticas según el riesgo calculado. El más conocido es el *score de Framingham*, que nos permite determinar el riesgo de padecer enfermedad coronaria en 10 años; es un algoritmo de predicción de riesgo multivariable, incluyendo los siguientes factores para el cálculo: edad, género, consumo de tabaco, CT, c.-LDL, c.-HDL, TAS y diabetes mellitus (13, 207), aunque algunos autores opinan que este score sobreestima el riesgo de enfermedad coronaria en poblaciones europeas. Por este motivo, la Sociedad Europea de Cardiología y The Second Joint Task Force desarrollaron un sistema de clasificación de riesgo, utilizando datos de 12 países europeos, configurando el proyecto *SCORE* (14). Se calcularon ecuaciones para pacientes con enfermedad coronaria y enfermedad cardiovascular no coronaria, ofreciendo de esta forma una estimación directa del riesgo cardiovascular fatal total en 10 años. El proyecto se llevó a cabo en tres fases: primero el desarrollo de cuadros de riesgo simple para poblaciones europeas de bajo y alto riesgo; segundo el desarrollo de métodos para crear gráficos de riesgo basados en datos publicados de mortalidad; finalmente la integración de los datos en una aplicación informática. El SCORE es uno

de los métodos más utilizados para estimar el riesgo cardiovascular mortal total en la práctica médica diaria. El estudio prospectivo *PROCAM* (208) realizado en el noroeste de Alemania con más de veinte mil sujetos sanos y con un seguimiento de ocho años, permitió establecer diferentes sistemas de puntuación que, de forma simple y precisa, nos indiquen: en primer lugar, el riesgo de desarrollar patología coronaria aguda utilizando las siguientes variables: edad, tabaquismo, TAS, c-LDL, c-HDL, TGs y diabetes mellitus, tenía un AUC ROC de 0,82; y en segundo lugar, un score para calcular el riesgo de eventos isquémicos cerebrales, incluyendo los siguientes factores: edad, género, diabetes mellitus, tabaquismo y TAS, con un AUC ROC de 0,78 (209). Ambos scores proporcionan formas simples y efectivas de evaluar el riesgo de eventos coronarios agudo o eventos isquémicos cerebrales permitiendo establecer medidas de prevención.

Por otro lado, se han realizado diversos estudios con grandes cohortes de pacientes que estudian la relación de LTL con los diferentes factores riesgo de enfermedad cardiovascular. El metanálisis de Gardner (210), donde se incluyeron a 36.230 participantes, permitió probar la hipótesis de que las mujeres tiene LTL más largos que los hombres estableciendo así una diferencia según el género. Para valorar la relación de LTL con el género y la edad se realizó un estudio en la cohorte GERA, incluyendo a más de 100.000 individuos, tras procesar las muestras por triplicado se demostró una correlación negativa con la edad hasta los 75 años y con el género femenino a partir de los 50 años (211). En un subanálisis de 6.468 participantes de la base de datos NANHES se valoró la asociación de LTL con lipoproteínas encontrando una asociación positiva con los niveles de c-HDL (196). Por último, en un análisis reciente realizado en 4.944 sujetos del Gutenberg Health Study, estudio de cohortes prospectivo, observacional y basado en la comunidad, se valoró la asociación de RTL con factores de riesgo cardiovascular, encontrando una asociación significativa con la edad, el tabaquismo y los niveles de c-LDL (212).

Sin embargo, actualmente no existe un modelo para la predicción del envejecimiento biológico en pacientes con patología coronaria, que nos permita analizar conjuntamente parámetros clínicos, inflamatorios y oxidativos. Por lo tanto, nuestros resultados proporcionan una nueva herramienta para mejorar el diagnóstico de pacientes con enfermedad coronaria, agregando el cálculo del envejecimiento biológico durante la valoración médica. Nuestro modelo predictivo evaluará el grado de envejecimiento de una persona, identificando a los pacientes que se beneficiarían de un manejo terapéutico intensivo y una correcta prevención secundaria, permitiendo mejorar la calidad de vida de los pacientes y optimizar el gasto sanitario.

Al mismo tiempo, nos permite analizar la interacción de la longitud de los telómeros con la inflamación y el estrés oxidativo. Esta asociación ya fue descrita por Tian (213), que propuso una disminución en la capacidad antioxidante como un factor importante que acelera el desgaste de los telómeros en pacientes coronarios prematuros. Sin embargo, sigue siendo incierto si el acortamiento de los telómeros es una causa de enfermedad cardiovascular o simplemente una consecuencia (214).

Entre las limitaciones de nuestro estudio debemos comentar que, aunque hemos implementado una validación interna, la generalización de nuestros resultados debe investigarse en otras poblaciones que nos permitan validar el modelo propuesto. Por otro lado, otro factor limitante del estudio podría ser no haber determinado otros marcadores de senescencia propuestos en la literatura (reloj epigenético, marcadores de senescencia, metilación del ADN) (215). Sin embargo, en el presente trabajo hemos decidido resaltar el efecto que los marcadores de inflamación y estrés oxidativo pueden tener sobre el grado de acortamiento telomérico. El tamaño de la muestra también podría ser un factor limitante, pero este trabajo es un subanálisis dentro del estudio CORDIOPREV, donde la identificación de la senescencia biológica no era un objetivo final primario. Hasta donde sabemos, los modelos que exploramos aquí son los primeros en ser propuestos para establecer el grado de senescencia biológica en pacientes coronarios.

Entre las fortalezas de nuestro estudio, es importante resaltar que aborda un tema que contribuirá a la identificación más precisa de la senescencia biológica en un conjunto de pacientes con alto riesgo vascular, identificando precozmente aquellos que deben ser tratados de manera más agresiva. Adicionalmente, los modelos se han diseñado de forma escalable, destacando el modelo reducido como el más rentable por el número de variables utilizadas y los resultados obtenidos. El principal, que desde ahora disponemos de una nueva herramienta que nos permita, en la práctica clínica diaria con nuestros pacientes coronarios, conocer un nuevo dato que modificará nuestra actitud en el manejo y seguimiento de la patología cardiovascular, enfocado hacia la Medicina Personalizada y de Precisión que impera en la actualidad.

En resumen, en el marco del estudio CORDIPREV demostramos que estos modelos predictivos nos permiten analizar el grado de senescencia biológica en pacientes con alto riesgo cardiovascular y así poder establecer un tratamiento personalizado para un control óptimo basado en los resultados y poder prevenir complicaciones cardio-metabólicas.

DIRECCIONES FUTURAS DE LA INVESTIGACIÓN

La determinación de RTL de los pacientes del CORDIOPREV se realizó tanto al inicio del estudio como a los 4 años. En el futuro, una vez concluido el estudio y analizado el objetivo principal, podremos conocer la mortalidad o presencia de nuevos eventos cardiovasculares en los pacientes, y de esta forma seguir profundizando en esta área tan importante para nuestro sistema sanitario: el envejecimiento y las enfermedades cardiovasculares.

Los resultados derivados de esta tesis doctoral han servido para implementar una plataforma de e-Health, llamada "NUTRICLOCK", que evalúa el grado de envejecimiento y que pretende recomendar un régimen de tratamiento personalizado basado en pruebas clínicas, biológicas y genéticas, definiendo un determinado perfil del paciente. NUTRICLOCK está registrada siendo propiedad del Servicio Andaluz de Salud, Universidad de Córdoba y CIBEROBN, con el número de registro **RPI201799901594741**.

VIII. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRINCIPAL

Nuestros resultados han permitido desarrollar diferentes modelos predictivos para graduar el grado de senescencia biológica en pacientes con alto riesgo cardiovascular:

- Un modelo basal incluyendo edad, género, índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, frecuencia cardiaca, colesterol HDL, triglicéridos en ayunas, PCR-us y HOMA-IR con una capacidad predictiva de un AUC ROC = 0,64.
- Un modelo extendido incluyendo los parámetros del modelo basal junto a glutatión total, glutatión reducido, glutatión oxidado, glutatión peroxidado, catalasa, superóxido dismutasa, proteínas carboniladas, óxido nítrico, productos de peroxidación lipídica, proteína quimiotáctica de monocitos-1, TNF- α , adiponectina, IL-1 β , IL6, resistina y leptina con una capacidad predictiva de un AUC ROC = 0,75.
- Un modelo reducido incluyendo los parámetros del modelo basal junto a catalasa, superóxido dismutasa, productos de peroxidación de lípidos, IL-1 β y resistina con una capacidad predictiva de un AUC ROC = 0,72.

Por tanto, el modelo reducido y considerando el número de variables incluidas, tendría una mejor capacidad predictiva comparado con el modelo extendido, para determinar el grado de senescencia biológica.

CONCLUSIONES SECUNDARIAS

Nuestros resultados muestran que el desarrollo de un modelo genético que incluye la información aportada por el SNP *rs2802292* junto a los parámetros del modelo reducido (edad, género, índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, presión

arterial sistólica, presión arterial diastólica, frecuencia cardíaca, colesterol HDL, triglicéridos en ayunas, PCR-us, HOMA-IR, catalasa, superóxido dismutasa, productos de peroxidación de lípidos, IL-1 β y resistina) proporcionan una discreta mejoría en la capacidad de predicción de senescencia biológica con un AUC ROC = 0,74.

IX. ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ANOVA: análisis de la varianza.

ARA-II: antagonistas de los receptores de angiotensina II.

ATP III - NCEP: Adult Treatment Panel III - National Cholesterol Education Program.

AUC: área bajo la curva.

CARDIoGRAM: The Coronary Artery Disease Genome-Wide Replication and Meta-Analysis Study.

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.

CT: colesterol total.

DM2: diabetes mellitus tipo 2.

ENGAGE: European Network for Genetic and Genomic Epidemiology.

eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial.

GERA: Adult Health and Aging.

GPX: glutatión peroxidado.

GSH: glutatión reducido.

GSSG: glutatión oxidado

HbA1c: hemoglobina glicosilada.

HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance.

HTA: hipertensión arterial.

IAM: infarto agudo de miocardio.

ICAM: moléculas de adhesión intercelulares.

IL-1: interleucina 1.

IL-6: interleucina 6.

IMC: índice de masa corporal.

InCHIANTI: Invecchiare in Chianti study.

LIPGENE: Diet, genomics and the metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis.

LPO: productos de peroxidación lipídica.

LTL: longitud de telómeros de los leucocitos.

MCP-1: proteína quimiotáctica de los monocitos 1.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NF- κ B: factor de transcripción nuclear kappaB

NHANES: US National Health and Nutrition Examination Survey

NO: óxido nítrico.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PA: presión arterial.

PC: proteínas carboniladas.

PCR-us: proteína C reactiva ultrasensible.

PESA: Progression of Early Subclinical Atherosclerosis.

PLIC: the Progressione della Lesione Intimale Carotidea.

PREDIMED: PREvención con Dieta MEDiterránea.

PROCAM: The Münster Heart Study.

q-PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

RTL: longitud telomérica relativa.

ROC: característica operativa del receptor.

ROS: especies reactivas de oxígeno

RONS: especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

SCORE: Systematic COronary Risk Evaluation.

SMet: síndrome metabólico.

SNP: polimorfismo de nucleótido simple.

SOD: superóxido dismutasa.

TAD: tensión arterial diastólica.

TAS: tensión arterial sistólica.

tG: glutatión total.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

TGs: triglicéridos.

VCAM-1: moléculas de adhesión vasculares.

.

X. REFERENCIAS

1. 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.
2. Strehler BL. Origin and comparison of the effects of time and high-energy radiations on living systems. *Q Rev Biol*. 1959;34(2):117-42.
3. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*. 2018;217(1):65-77.
4. DALYs GBD, Collaborators H, Murray CJ, Barber RM, Foreman KJ, Abbasoglu Ozgoren A, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition. *Lancet*. 2015;386(10009):2145-91.
5. Katsuomi G, Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T. Vascular Senescence in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5:18.
6. Pignolo RJ. Exceptional Human Longevity. *Mayo Clin Proc*. 2019;94(1):110-24.
7. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095-128.
8. Niccoli T, Partridge L. Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol*. 2012;22(17):R741-52.
9. Clarke R, Emberson J, Fletcher A, Breeze E, Marmot M, Shipley MJ. Life expectancy in relation to cardiovascular risk factors: 38 year follow-up of 19,000 men in the Whitehall study. *BMJ*. 2009;339:b3513.

10. Pandya A, Gaziano TA, Weinstein MC, Cutler D. More americans living longer with cardiovascular disease will increase costs while lowering quality of life. *Health Aff (Millwood)*. 2013;32(10):1706-14.
11. Zhang W, Hui R, Yang S. Telomeres, cardiovascular aging, and potential intervention for cellular senescence. *Sci China Life Sci*. 2014;57(8):858-62.
12. Dhingra R, Vasan RS. Age as a risk factor. *Med Clin North Am*. 2012;96(1):87-91.
13. D'Agostino RB, Sr., Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117(6):743-53.
14. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 2003;24(11):987-1003.
15. Terry DF, Pencina MJ, Vasan RS, Murabito JM, Wolf PA, Hayes MK, et al. Cardiovascular risk factors predictive for survival and morbidity-free survival in the oldest-old Framingham Heart Study participants. *J Am Geriatr Soc*. 2005;53(11):1944-50.
16. Costa E, Santos-Silva A, Paul C, Gonzalez Gallego J. Aging and cardiovascular risk. *Biomed Res Int*. 2015;2015:871656.
17. Buford TW. Hypertension and aging. *Ageing Res Rev*. 2016;26:96-111.
18. Palmer AK, Gustafson B, Kirkland JL, Smith U. Cellular senescence: at the nexus between ageing and diabetes. *Diabetologia*. 2019;62(10):1835-41.
19. Kim YH, Park TJ. Cellular senescence in cancer. *BMB Rep*. 2019;52(1):42-6.
20. Kritsilis M, S VR, Koutsoudaki PN, Evangelou K, Gorgoulis VG, Papadopoulos D. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10).

21. de Magalhaes JP, Wuttke D, Wood SH, Plank M, Vora C. Genome-environment interactions that modulate aging: powerful targets for drug discovery. *Pharmacol Rev.* 2012;64(1):88-101.
22. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.
23. Yanai H, Fraifeld VE. The role of cellular senescence in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev.* 2018;41:18-33.
24. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:685-705.
25. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 2012;481(7381):287-94.
26. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25:585-621.
27. Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol.* 2007;3(10):640-9.
28. Boonekamp JJ, Simons MJ, Hemerik L, Verhulst S. Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. *Aging Cell.* 2013;12(2):330-2.
29. Spear ED, Alford RF, Babatz TD, Wood KM, Mossberg OW, Odinammadu K, et al. A humanized yeast system to analyze cleavage of prelamin A by ZMPSTE24. *Methods.* 2019;157:47-55.
30. Tsurumi A, Li WX. Global heterochromatin loss: a unifying theory of aging? *Epigenetics.* 2012;7(7):680-8.

31. Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol.* 2018;217(1):51-63.
32. Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes.* 2012;61(6):1315-22.
33. Hiona A, Sanz A, Kujoth GC, Pamplona R, Seo AY, Hofer T, et al. Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice. *PLoS One.* 2010;5(7):e11468.
34. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011;479(7372):232-6.
35. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature.* 2007;447(7145):725-9.
36. Singh KP, Bennett JA, Casado FL, Walrath JL, Welle SL, Gasiewicz TA. Loss of aryl hydrocarbon receptor promotes gene changes associated with premature hematopoietic stem cell exhaustion and development of a myeloproliferative disorder in aging mice. *Stem Cells Dev.* 2014;23(2):95-106.
37. Sadighi Akha AA. Aging and the immune system: An overview. *J Immunol Methods.* 2018;463:21-6.
38. Foulke BA, Kendal AR, Murray DW, Pandit H. Fracture healing in the elderly: A review. *Maturitas.* 2016;92:49-55.
39. Sousa-Victor P, Garcia-Prat L, Serrano AL, Perdiguero E, Muñoz-Canoves P. Muscle stem cell aging: regulation and rejuvenation. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(6):287-96.

40. Flores I, Blasco MA. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett.* 2010;584(17):3826-30.
41. Chuang SY, Lin CH, Fang JY. Natural compounds and aging: between autophagy and inflammasome. *Biomed Res Int.* 2014;2014:297293.
42. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005;6(8):611-22.
43. Martinez P, Blasco MA. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *J Cell Biol.* 2017;216(4):875-87.
44. Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol.* 1972;239(94):197-201.
45. Batista LF. Telomere biology in stem cells and reprogramming. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;125:67-88.
46. Rossiello F, Herbig U, Longhese MP, Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing. *Curr Opin Genet Dev.* 2014;26:89-95.
47. Bar C, Blasco MA. Telomeres and telomerase as therapeutic targets to prevent and treat age-related diseases. *F1000Res.* 2016;5.
48. Tellechea ML, Pirola CJ. The impact of hypertension on leukocyte telomere length: a systematic review and meta-analysis of human studies. *J Hum Hypertens.* 2017;31(2):99-105.
49. Wang J, Dong X, Cao L, Sun Y, Qiu Y, Zhang Y, et al. Association between telomere length and diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Int Med Res.* 2016;44(6):1156-73.
50. D'Mello MJ, Ross SA, Briel M, Anand SS, Gerstein H, Pare G. Association between shortened leukocyte telomere length and cardiometabolic outcomes: systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015;8(1):82-90.

51. Scheller Madrid A, Rasmussen KL, Rode L, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Observational and genetic studies of short telomeres and Alzheimer's disease in 67,000 and 152,000 individuals: a Mendelian randomization study. *Eur J Epidemiol.* 2020;35(2):147-56.
52. Herrmann M, Pusceddu I, Marz W, Herrmann W. Telomere biology and age-related diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2018;56(8):1210-22.
53. Wang Q, Zhan Y, Pedersen NL, Fang F, Hagg S. Telomere Length and All-Cause Mortality: A Meta-analysis. *Ageing Res Rev.* 2018;48:11-20.
54. Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1019:278-84.
55. Aviv A. Genetics of leukocyte telomere length and its role in atherosclerosis. *Mutat Res.* 2012;730(1-2):68-74.
56. Yeh JK, Lin MH, Wang CY. Telomeres as Therapeutic Targets in Heart Disease. *JACC Basic Transl Sci.* 2019;4(7):855-65.
57. Boccardi V, Barbieri M, Rizzo MR, Marfella R, Esposito A, Marano L, et al. A new pleiotropic effect of statins in elderly: modulation of telomerase activity. *FASEB J.* 2013;27(9):3879-85.
58. Bennaceur K, Atwill M, Al Zhrany N, Hoffmann J, Keavney B, Breault D, et al. Atorvastatin induces T cell proliferation by a telomerase reverse transcriptase (TERT) mediated mechanism. *Atherosclerosis.* 2014;236(2):312-20.
59. Rodriguez-Rodero S, Fernandez-Morera JL, Menendez-Torre E, Calvanese V, Fernandez AF, Fraga MF. Aging genetics and aging. *Aging Dis.* 2011;2(3):186-95.
60. Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, et al. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science.* 1996;272(5259):258-62.

61. Tikoo S, Sengupta S. Time to bloom. *Genome Integr.* 2010;1(1):14.
62. Larizza L, Roversi G, Volpi L. Rothmund-Thomson syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:2.
63. Dominguez-Gerpe L, Araujo-Vilar D. Prematurely aged children: molecular alterations leading to Hutchinson-Gilford progeria and Werner syndromes. *Curr Aging Sci.* 2008;1(3):202-12.
64. Burtner CR, Kennedy BK. Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(8):567-78.
65. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature.* 2010;464(7288):504-12.
66. Argon Y, Gidalevitz T. Candidate genes that affect aging through protein homeostasis. *Adv Exp Med Biol.* 2015;847:45-72.
67. Morris BJ, Willcox BJ, Donlon TA. Genetic and epigenetic regulation of human aging and longevity. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(7):1718-44.
68. de Magalhaes JP, Toussaint O. GenAge: a genomic and proteomic network map of human ageing. *FEBS Lett.* 2004;571(1-3):243-7.
69. Budovsky A, Craig T, Wang J, Tacutu R, Csordas A, Lourenco J, et al. LongevityMap: a database of human genetic variants associated with longevity. *Trends Genet.* 2013;29(10):559-60.
70. Schachter F, Faure-Delanef L, Guenot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, et al. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Genet.* 1994;6(1):29-32.
71. Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Nomani H, Tavilani H, Pourmotabbed T. The presence of apolipoprotein epsilon4 and epsilon2 alleles augments the risk of coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Clin Biochem.* 2007;40(15):1150-6.

72. Chasman DI, Kozlowski P, Zee RY, Kwiatkowski DJ, Ridker PM. Qualitative and quantitative effects of APOE genetic variation on plasma C-reactive protein, LDL-cholesterol, and apoE protein. *Genes Immun.* 2006;7(3):211-9.
73. Xu M, Zhao J, Zhang Y, Ma X, Dai Q, Zhi H, et al. Apolipoprotein E Gene Variants and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2016;2016:3912175.
74. Arai Y, Sasaki T, Hirose N. Demographic, phenotypic, and genetic characteristics of centenarians in Okinawa and Honshu, Japan: Part 2 Honshu, Japan. *Mech Ageing Dev.* 2017;165(Pt B):80-5.
75. Sebastiani P, Bae H, Gurinovich A, Soerensen M, Puca A, Perls TT. Limitations and risks of meta-analyses of longevity studies. *Mech Ageing Dev.* 2017;165(Pt B):139-46.
76. Gao AW, Smith RL, van Weeghel M, Kamble R, Janssens GE, Houtkooper RH. Identification of key pathways and metabolic fingerprints of longevity in *C. elegans*. *Exp Gerontol.* 2018;113:128-40.
77. Martins R, Lithgow GJ, Link W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell.* 2016;15(2):196-207.
78. Bae H, Gurinovich A, Malovini A, Atzmon G, Andersen SL, Villa F, et al. Effects of FOXO3 Polymorphisms on Survival to Extreme Longevity in Four Centenarian Studies. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018;73(11):1439-47.
79. Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanche H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, et al. Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(8):2700-5.

80. Anselmi CV, Malovini A, Roncarati R, Novelli V, Villa F, Condorelli G, et al. Association of the FOXO3A locus with extreme longevity in a southern Italian centenarian study. *Rejuvenation Res.* 2009;12(2):95-104.
81. Willcox BJ, Donlon TA, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, et al. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(37):13987-92.
82. Donlon TA, Morris BJ, Chen R, Masaki KH, Allsopp RC, Willcox DC, et al. FOXO3 longevity interactome on chromosome 6. *Aging Cell.* 2017;16(5):1016-25.
83. Ruparelia N, Chai JT, Fisher EA, Choudhury RP. Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(3):133-44.
84. Leonardi GC, Accardi G, Monastero R, Nicoletti F, Libra M. Ageing: from inflammation to cancer. *Immun Ageing.* 2018;15:1.
85. Ebert T, Pawelzik SC, Witasp A, Arefin S, Hobson S, Kublickiene K, et al. Inflammation and Premature Ageing in Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel).* 2020;12(4).
86. Gorelick PB. Role of inflammation in cognitive impairment: results of observational epidemiological studies and clinical trials. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1207:155-62.
87. Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(1):22-34.
88. Soysal P, Stubbs B, Lucato P, Luchini C, Solmi M, Peluso R, et al. Corrigendum to "Inflammation and frailty in the elderly: A systematic review and meta-analysis" [*Ageing Res Rev.* 31 (2016) 1-8]. *Ageing Res Rev.* 2017;35:364-5.

89. Ferrucci L, Semba RD, Guralnik JM, Ershler WB, Bandinelli S, Patel KV, et al. Proinflammatory state, hepcidin, and anemia in older persons. *Blood*. 2010;115(18):3810-6.
90. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(10):576-90.
91. Franceschi C, Garagnani P, Vitale G, Capri M, Salvioli S. Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(3):199-212.
92. Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):505-22.
93. Cesari M, Kritchevsky SB, Nicklas B, Kanaya AM, Patrigiani P, Tacconelli S, et al. Oxidative damage, platelet activation, and inflammation to predict mobility disability and mortality in older persons: results from the health aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67(6):671-6.
94. Nakhai-Pour HR, Grobbee DE, Bots ML, Muller M, van der Schouw YT. C-reactive protein and aortic stiffness and wave reflection in middle-aged and elderly men from the community. *J Hum Hypertens*. 2007;21(12):949-55.
95. Wang M, Jiang L, Monticone RE, Lakatta EG. Proinflammation: the key to arterial aging. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(2):72-9.
96. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-25.
97. Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res*. 2006;99(2):156-64.

98. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation*. 2003;108(19):2317-22.
99. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res*. 2007;100(11):1659-66.
100. Yu BP, Chung HY. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(5):436-43.
101. Hasegawa Y, Saito T, Ogihara T, Ishigaki Y, Yamada T, Imai J, et al. Blockade of the nuclear factor-kappaB pathway in the endothelium prevents insulin resistance and prolongs life spans. *Circulation*. 2012;125(9):1122-33.
102. Fontana L. Neuroendocrine factors in the regulation of inflammation: excessive adiposity and calorie restriction. *Exp Gerontol*. 2009;44(1-2):41-5.
103. LaRocca TJ, Martens CR, Seals DR. Nutrition and other lifestyle influences on arterial aging. *Ageing Res Rev*. 2017;39:106-19.
104. El Assar M, Angulo J, Rodriguez-Manas L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:380-401.
105. Venkataraman K, Khurana S, Tai TC. Oxidative stress in aging--matters of the heart and mind. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):17897-925.
106. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. 1998;78(2):547-81.

107. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(14):1144-70.
108. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1-40.
109. Salisbury D, Bronas U. Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction. *Nurs Res*. 2015;64(1):53-66.
110. Chandrasekaran A, Idelchik M, Melendez JA. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol*. 2017;11:91-102.
111. De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des*. 2009;15(26):3003-26.
112. Pignatelli P, Menichelli D, Pastori D, Violi F. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights. *Kardiol Pol*. 2018;76(4):713-22.
113. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2019;24(8).
114. Duni A, Liakopoulos V, Roumeliotis S, Peschos D, Dounousi E. Oxidative Stress in the Pathogenesis and Evolution of Chronic Kidney Disease: Untangling Ariadne's Thread. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15).
115. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*. 2016;7(29):44879-905.
116. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Prada GI. Oxidized LDL and NO synthesis--Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2015;151:101-13.

117. Zuo L, Prather ER, Stetskiv M, Garrison DE, Meade JR, Peace TI, et al. Inflammaging and Oxidative Stress in Human Diseases: From Molecular Mechanisms to Novel Treatments. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).
118. Hulsegge G, Looman M, Smit HA, Daviglius ML, van der Schouw YT, Verschuren WM. Lifestyle Changes in Young Adulthood and Middle Age and Risk of Cardiovascular Disease and All-Cause Mortality: The Doetinchem Cohort Study. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(1).
119. Chiao YA, Rabinovitch PS. The Aging Heart. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(9):a025148.
120. Perez-Martinez P, Garcia-Quintana JM, Yubero-Serrano EM, Tasset-Cuevas I, Tunez I, Garcia-Rios A, et al. Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. *Clin Sci (Lond).* 2010;119(6):251-61.
121. Gremeaux V, Gayda M, Lepers R, Sosner P, Juneau M, Nigam A. Exercise and longevity. *Maturitas.* 2012;73(4):312-7.
122. Santos-Parker JR, LaRocca TJ, Seals DR. Aerobic exercise and other healthy lifestyle factors that influence vascular aging. *Adv Physiol Educ.* 2014;38(4):296-307.
123. Durrant JR, Seals DR, Connell ML, Russell MJ, Lawson BR, Folian BJ, et al. Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. *J Physiol.* 2009;587(Pt 13):3271-85.
124. Shinmura K. Cardiovascular protection afforded by caloric restriction: essential role of nitric oxide synthase. *Geriatr Gerontol Int.* 2011;11(2):143-56.

125. Donato AJ, Walker AE, Magerko KA, Bramwell RC, Black AD, Henson GD, et al. Life-long caloric restriction reduces oxidative stress and preserves nitric oxide bioavailability and function in arteries of old mice. *Aging Cell*. 2013;12(5):772-83.
126. Bellido C, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio LM, Perez-Martinez P, Muriana FJ, Martin-Ventura JL, et al. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6):1487-91.
127. Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio L, Bellido C, Jimenez Y, Moreno JA, et al. The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Atherosclerosis*. 2007;194(2):e141-6.
128. Yubero-Serrano EM, Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Delgado-Casado N, Perez-Martinez P, Rodriguez-Cantalejo F, et al. Postprandial effects of the Mediterranean diet on oxidant and antioxidant status in elderly men and women. *J Am Geriatr Soc*. 2011;59(5):938-40.
129. Ungvari Z, Parrado-Fernandez C, Csiszar A, de Cabo R. Mechanisms underlying caloric restriction and lifespan regulation: implications for vascular aging. *Circ Res*. 2008;102(5):519-28.
130. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, et al. Retraction and Republication: Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N Engl J Med* 2013;368:1279-90. *N Engl J Med*. 2018;378(25):2441-2.
131. Gomez-Delgado F, Katsiki N, Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P. Dietary habits, lipoprotein metabolism and cardiovascular disease: From individual foods to dietary patterns. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020:1-19.

132. König IR, Fuchs O, Hansen G, von Mutius E, Kopp MV. What is precision medicine? *Eur Respir J*. 2017;50(4).
133. Jameson JL, Longo DL. Precision medicine--personalized, problematic, and promising. *N Engl J Med*. 2015;372(23):2229-34.
134. McGrath S, Gherzi D. Building towards precision medicine: empowering medical professionals for the next revolution. *BMC Med Genomics*. 2016;9(1):23.
135. Antman EM, Loscalzo J. Precision medicine in cardiology. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(10):591-602.
136. Wallace E, Smith SM, Perera-Salazar R, Vaucher P, McCowan C, Collins G, et al. Framework for the impact analysis and implementation of Clinical Prediction Rules (CPRs). *BMC Med Inform Decis Mak*. 2011;11:62.
137. 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.
138. Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Crit Pathw Cardiol*. 2005;4(4):198-203.
139. Elosua R, Garcia M, Aguilar A, Molina L, Covas MI, Marrugat J. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire In Spanish Women. Investigators of the MARATDON Group. *Med Sci Sports Exerc*. 2000;32(8):1431-7.

140. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.
141. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21.
142. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
143. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(10):e47.
144. 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.
145. Murtaza G, Khan AK, Rashid R, Muneer S, Hasan SMF, Chen J. FOXO Transcriptional Factors and Long-Term Living. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:3494289.
146. Rehkopf DH, Needham BL, Lin J, Blackburn EH, Zota AR, Wojcicki JM, et al. Leukocyte Telomere Length in Relation to 17 Biomarkers of Cardiovascular Disease Risk: A Cross-Sectional Study of US Adults. *PLoS Med.* 2016;13(11):e1002188.
147. Gomez-Delgado F, Alcalá-Díaz JF, García-Ríos A, Delgado-Lista J, Ortiz-Morales A, Rangel-Zuniga O, et al. Polymorphism at the TNF-alpha gene interacts with Mediterranean diet to influence triglyceride metabolism and inflammation status in metabolic syndrome patients: From the CORDIOPREV clinical trial. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(7):1519-27.
148. Harrell FE, Jr., Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med.* 1996;15(4):361-87.

149. Ortiz-Morales AM, Alcalá-Díaz JF, Rangel-Zuniga OA, Corina A, Quintana-Navarro G, Cardelo MP, et al. Biological senescence risk score. A practical tool to predict biological senescence status. *Eur J Clin Invest*. 2020;50(11):e13305.
150. Wang JC, Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res*. 2012;111(2):245-59.
151. Heidenreich PA, Trogdon JG, Khavjou OA, Butler J, Dracup K, Ezekowitz MD, et al. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(8):933-44.
152. Corella D, Ordovas JM. Aging and cardiovascular diseases: the role of gene-diet interactions. *Ageing Res Rev*. 2014;18:53-73.
153. Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, Butterworth AS, Thompson A, Willeit P. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014;349:g4227.
154. Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, et al. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol*. 2007;165(1):14-21.
155. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*. 2003;361(9355):393-5.
156. Pusceddu I, Kleber M, Delgado G, Herrmann W, Marz W, Herrmann M. Telomere length and mortality in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *PLoS One*. 2018;13(6):e0198373.

157. Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Kimura M, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, et al. Leukocyte telomere length and mortality in the Cardiovascular Health Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011;66(4):421-9.
158. Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, Thompson JR, Ford I, Shepherd J, et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet*. 2007;369(9556):107-14.
159. Farzaneh-Far R, Cawthon RM, Na B, Browner WS, Schiller NB, Whooley MA. Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(7):1379-84.
160. Scheller Madrid A, Rode L, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Short Telomere Length and Ischemic Heart Disease: Observational and Genetic Studies in 290 022 Individuals. *Clin Chem*. 2016;62(8):1140-9.
161. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2011;43(4):333-8.
162. Consortium CAD, Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2013;45(1):25-33.
163. Mainous AG, 3rd, Codd V, Diaz VA, Schoepf UJ, Everett CJ, Player MS, et al. Leukocyte telomere length and coronary artery calcification. *Atherosclerosis*. 2010;210(1):262-7.

164. Kroenke CH, Pletcher MJ, Lin J, Blackburn E, Adler N, Matthews K, et al. Telomerase, telomere length, and coronary artery calcium in black and white men in the CARDIA study. *Atherosclerosis*. 2012;220(2):506-12.
165. Kark JD, Nassar H, Shaham D, Sinnreich R, Goldberger N, Aboudi V, et al. Leukocyte telomere length and coronary artery calcification in Palestinians. *Atherosclerosis*. 2013;229(2):363-8.
166. Norata GD, Garlaschelli K, Ongari M, Raselli S, Grigore L, Benvenuto F, et al. Effect of the Toll-like receptor 4 (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *J Intern Med*. 2005;258(1):21-7.
167. Baragetti A, Knoflach M, Cuccovillo I, Grigore L, Casula M, Garlaschelli K, et al. Pentraxin 3 (PTX3) plasma levels and carotid intima media thickness progression in the general population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014;24(5):518-23.
168. Baragetti A, Palmen J, Garlaschelli K, Grigore L, Pellegatta F, Tragni E, et al. Telomere shortening over 6 years is associated with increased subclinical carotid vascular damage and worse cardiovascular prognosis in the general population. *J Intern Med*. 2015;277(4):478-87.
169. Willeit J, Kiechl S, Oberhollenzer F, Rungger G, Egger G, Bonora E, et al. Distinct risk profiles of early and advanced atherosclerosis: prospective results from the Bruneck Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(2):529-37.
170. Willeit P, Willeit J, Brandstatter A, Ehrlenbach S, Mayr A, Gasperi A, et al. Cellular aging reflected by leukocyte telomere length predicts advanced atherosclerosis and cardiovascular disease risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(8):1649-56.

171. Fernandez-Alvira JM, Fuster V, Dorado B, Soberon N, Flores I, Gallardo M, et al. Short Telomere Load, Telomere Length, and Subclinical Atherosclerosis: The PESA Study. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(21):2467-76.
172. Howcroft TK, Campisi J, Louis GB, Smith MT, Wise B, Wyss-Coray T, et al. The role of inflammation in age-related disease. *Aging (Albany NY)*. 2013;5(1):84-93.
173. Fabbri E, An Y, Zoli M, Simonsick EM, Guralnik JM, Bandinelli S, et al. Aging and the burden of multimorbidity: associations with inflammatory and anabolic hormonal biomarkers. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015;70(1):63-70.
174. Bektas A, Schurman SH, Sen R, Ferrucci L. Aging, inflammation and the environment. *Exp Gerontol*. 2018;105:10-8.
175. Lopizzo N, Tosato S, Begni V, Tomassi S, Cattane N, Barcella M, et al. Transcriptomic analyses and leukocyte telomere length measurement in subjects exposed to severe recent stressful life events. *Transl Psychiatry*. 2017;7(2):e1042.
176. O'Donovan A, Pantell MS, Puterman E, Dhabhar FS, Blackburn EH, Yaffe K, et al. Cumulative inflammatory load is associated with short leukocyte telomere length in the Health, Aging and Body Composition Study. *PLoS One*. 2011;6(5):e19687.
177. Wong JY, De Vivo I, Lin X, Fang SC, Christiani DC. The relationship between inflammatory biomarkers and telomere length in an occupational prospective cohort study. *PLoS One*. 2014;9(1):e87348.
178. Grebe A, Hoss F, Latz E. NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2018;122(12):1722-40.
179. Koliaki C, Liatis S, Kokkinos A. Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship. *Metabolism*. 2019;92:98-107.

180. Rankin JW, Andreae MC, Oliver Chen CY, O'Keefe SF. Effect of raisin consumption on oxidative stress and inflammation in obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2008;10(11):1086-96.
181. Suzuki K, Ito Y, Ochiai J, Kusuhara Y, Hashimoto S, Tokudome S, et al. Relationship between obesity and serum markers of oxidative stress and inflammation in Japanese. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2003;4(3):259-66.
182. Lee M, Martin H, Firpo MA, Demerath EW. Inverse association between adiposity and telomere length: The Fels Longitudinal Study. *Am J Hum Biol.* 2011;23(1):100-6.
183. Farr OM, Gavrieli A, Mantzoros CS. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015;22(5):353-9.
184. Wang MY, Orci L, Ravazzola M, Unger RH. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(50):18011-6.
185. Conde J, Scotece M, Gomez R, Gomez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. At the crossroad between immunity and metabolism: focus on leptin. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010;6(5):801-8.
186. Broer L, Raschenberger J, Deelen J, Mangino M, Codd V, Pietilainen KH, et al. Association of adiponectin and leptin with relative telomere length in seven independent cohorts including 11,448 participants. *Eur J Epidemiol.* 2014;29(9):629-38.
187. Estienne A, Bongrani A, Reverchon M, Rame C, Ducluzeau PH, Froment P, et al. Involvement of Novel Adipokines, Chemerin, Visfatin, Resistin and Apelin in Reproductive Functions in Normal and Pathological Conditions in Humans and Animal Models. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).

188. Filkova M, Haluzik M, Gay S, Senolt L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol.* 2009;133(2):157-70.
189. Chen C, Jiang J, Lu JM, Chai H, Wang X, Lin PH, et al. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(1):H193-201.
190. Jamaluddin MS, Yan S, Lu J, Liang Z, Yao Q, Chen C. Resistin increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells. *PLoS One.* 2013;8(12):e84576.
191. Brenner DR, Tepylo K, Eny KM, Cahill LE, El-Sohemy A. Comparison of body mass index and waist circumference as predictors of cardiometabolic health in a population of young Canadian adults. *Diabetol Metab Syndr.* 2010;2(1):28.
192. Kim S, Parks CG, DeRoo LA, Chen H, Taylor JA, Cawthon RM, et al. Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(3):816-20.
193. Cassidy A, De Vivo I, Liu Y, Han J, Prescott J, Hunter DJ, et al. Associations between diet, lifestyle factors, and telomere length in women. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(5):1273-80.
194. Zgheib NK, Sleiman F, Nasreddine L, Nasrallah M, Nakhoul N, Isma'eel H, et al. Short Telomere Length is Associated with Aging, Central Obesity, Poor Sleep and Hypertension in Lebanese Individuals. *Aging Dis.* 2018;9(1):77-89.
195. Le Bras A. Lipoprotein(a) is an independent predictor of CVD. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(12):727.

196. Chen YF, Zhou KW, Yang GZ, Chen C. Association between lipoproteins and telomere length in US adults: data from the NHANES 1999-2002. *Lipids Health Dis.* 2019;18(1):80.
197. Jones DP. Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging. *Rejuvenation Res.* 2006;9(2):169-81.
198. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med.* 2005;26(4-5):340-52.
199. Tierney AC, McMonagle J, Shaw DI, Gulseth HL, Helal O, Saris WH, et al. Effects of dietary fat modification on insulin sensitivity and on other risk factors of the metabolic syndrome--LIPGENE: a European randomized dietary intervention study. *Int J Obes (Lond).* 2011;35(6):800-9.
200. Gonzalez-Guardia L, Yubero-Serrano EM, Rangel-Zuniga O, Marin C, Camargo A, Perez-Martinez P, et al. Influence of endothelial dysfunction on telomere length in subjects with metabolic syndrome: LIPGENE study. *Age (Dordr).* 2014;36(4):9681.
201. Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y, Itoh T, Minami Y, Nakamura M. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2008;198(2):347-53.
202. Sanese P, Forte G, Disciglio V, Grossi V, Simone C. FOXO3 on the Road to Longevity: Lessons From SNPs and Chromatin Hubs. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:737-45.
203. Davy PMC, Willcox DC, Shimabukuro M, Donlon TA, Torigoe T, Suzuki M, et al. Minimal Shortening of Leukocyte Telomere Length Across Age Groups in a Cross-

Sectional Study for Carriers of a Longevity-Associated FOXO3 Allele. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018;73(11):1448-52.

204. Morris BJ, Willcox DC, Donlon TA, Willcox BJ. FOXO3: A Major Gene for Human Longevity--A Mini-Review. *Gerontology*. 2015;61(6):515-25.

205. Revelas M, Thalamuthu A, Oldmeadow C, Evans TJ, Armstrong NJ, Kwok JB, et al. Review and meta-analysis of genetic polymorphisms associated with exceptional human longevity. *Mech Ageing Dev*. 2018;175:24-34.

206. Grossi V, Forte G, Sanese P, Peserico A, Tezil T, Lepore Signorile M, et al. The longevity SNP rs2802292 uncovered: HSF1 activates stress-dependent expression of FOXO3 through an intronic enhancer. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(11):5587-600.

207. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-47.

208. Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J*. 1998;19 Suppl A:A2-11.

209. Assmann G, Schulte H, Cullen P, Seedorf U. Assessing risk of myocardial infarction and stroke: new data from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(12):925-32.



210. Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, et al. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol*. 2014;51:15-27.

211. Lapham K, Kvale MN, Lin J, Connell S, Croen LA, Dispensa BP, et al. Automated Assay of Telomere Length Measurement and Informatics for 100,000 Subjects in the Genetic Epidemiology Research on Adult Health and Aging (GERA) Cohort. *Genetics*. 2015;200(4):1061-72.

212. Koriath M, Muller C, Pfeiffer N, Nickels S, Beutel M, Schmidtman I, et al. Relative Telomere Length and Cardiovascular Risk Factors. *Biomolecules*. 2019;9(5).
213. Tian R, Zhang LN, Zhang TT, Pang HY, Chen LF, Shen ZJ, et al. Association Between Oxidative Stress and Peripheral Leukocyte Telomere Length in Patients with Premature Coronary Artery Disease. *Med Sci Monit*. 2017;23:4382-90.
214. De Meyer T, Nawrot T, Bekaert S, De Buyzere ML, Rietzschel ER, Andres V. Telomere Length as Cardiovascular Aging Biomarker: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(7):805-13.
215. Sen P, Shah PP, Nativio R, Berger SL. Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell*. 2016;166(4):822-39.

XI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Biological senescence risk score. A practical tool to predict biological senescence status

Ana M. Ortiz-Morales^{1,2}  | Juan F. Alcala-Diaz^{1,2}  | Oriol A. Rangel-Zuñiga^{1,2} |
Andreea Corina^{1,2} | Gracia Quintana-Navarro^{1,2} | Magdalena P. Cardelo^{1,2} |
Elena Yubero-Serrano^{1,2} | Maria M. Malagon^{2,3} | Javier Delgado-Lista^{1,2} |
Jose M. Ordovas^{4,5,6} | Jose Lopez-Miranda^{1,2} | Pablo Perez-Martinez^{1,2}

¹Lipids and Atherosclerosis Unit, Department of Medicine, IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofia/Universidad de Cordoba, Cordoba, Spain

²CIBER Fisiopatologia Obesidad y Nutricion (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

³Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, Cordoba, Spain

⁴Nutrition and Genomics Laboratory, J.M.-US Department of Agriculture Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, MA, USA

⁵IMDEA Alimentacion, Madrid, Spain

⁶CNIC, Madrid, Spain

Correspondence

Pablo Perez-Martinez, Reina Sofia University Hospital, Lipids and Atherosclerosis Research Unit. Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba, Spain.
Email: pabloperez@uco.es

Funding information

The CORDIOPREV study has received research grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (FIS PI13/00185 to Pablo Perez-Martinez, AGL 2015-67896-P to Jose Lopez-Miranda, FIS PI13/0023 to Javier Delgado-Lista and FIS PI18/01822 to Elena M. Yubero-Serrano), integrated into the framework of the National Plan for Scientific Research, Technological Development and Innovation 2013-2016, co-financed by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) of Spain, the Directorate General for Assessment and Promotion of Research and the EU's European Regional Development Fund (FEDER), Fundacion Patrimonio Comunal Olivarero, CITOLIVA, CEAS, Junta de Andalucía (Consejería de Salud, Consejería de Agricultura y Pesca, Consejería

Abstract

Background: Ageing and biological senescence, both related to cardiovascular disease, are mediated by oxidative stress and inflammation. We aim to develop a predictive tool to evaluate the degree of biological senescence in coronary patients.

Methods: Relative telomere length (RTL) of 1002 coronary patients from the CORDIOPREV study (NCT00924937) was determined at baseline in addition to markers of inflammatory response (hs-C-Reactive Protein, monocyte chemoattractant protein-1, IL-6, IL-1 β , TNF- α , adiponectin, resistin and leptin) and oxidative stress (nitric oxide, lipid peroxidation products, carbonylated proteins, catalase, total glutathione, reduced glutathione, oxidized glutathione, superoxide dismutase and peroxidated glutathione). Biological senescence was defined using the cut-off value defined by the lower quintile of relative telomere length in our population (RTL = 0.7629). We generated and tested different predictive models based on logistic regression analysis to identify biological senescence. Three models were designed to be used with different sets of information.

Results: We selected those patients with all the variables proposed to develop the predictive models (n = 353). Statistically significant differences between both groups (Biological senescence vs. Nonbiological senescence) were found for total cholesterol, catalase, superoxide dismutase, IL-1 β , resistin and leptin. The area under the

Ana M. Ortiz-Morales and Juan F. Alcala-Diaz are equal first authors.

Jose Lopez-Miranda and Pablo Perez-Martinez are equal last authors.

© 2020 Stichting European Society for Clinical Investigation Journal Foundation

de Innovacion, Ciencia y Empresa), Diputaciones de Jaen y Cordoba, Centro de Excelencia en Investigacion sobre Aceite de Oliva y Salud and Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, Spanish Government. The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Jose M. Ordovas is supported by the US Department of Agriculture—Agricultural Research Service (ARS), under Agreement No. 58-1950-4-003. The funding source had no role in the study design, data analysis or interpretation, or writing of the manuscript.

curve of receiver-operating characteristic to predict biological senescence for our models was 0.65, 0.75 and 0.72.

Conclusions: These predictive models allow us to calculate the degree of biological senescence in coronary patients, identifying a subgroup of patients at higher risk and who may require more intensive treatment.

KEYWORDS

ageing, cardiovascular disease, CORDIOPREV study, predictive models

1 | INTRODUCTION

Ageing is a complex process that manifests itself within an organism at the cellular, molecular and genetic levels. One of the diseases that has been associated with ageing is cardiovascular disease, the leading cause of mortality in developed countries.¹

In turn, the shortening of telomeres is related as an independent marker of increased risk of cardiovascular disease.² This process can be mediated by different environmental factors that increase oxidative stress and inflammation.³ This allows us to postulate oxidative stress and cellular senescence as markers of human ageing.⁴ In this context, a meta-analysis of 24 studies, including 8400 patients with cardiovascular disease or stroke, estimated a higher relative risk for coronary heart disease for those patients with the shortest leukocyte telomere length (LTL).⁵ In a cross-sectional study of US adults from the NHANES, that examined the association between LTL and 17 cardiovascular biomarkers,² LTL was the most strongly associated with adiposity, showing the strongest inverse correlation with per cent body fat, body mass index and waist circumference. Even this relationship, between obesity and the shortening of LTL, is observed in children and adolescents.⁶

There is a direct relationship between epigenetics and ageing. Some studies suggest that changes in chromatin are influenced by environmental and metabolic factors.⁷ These changes may modify gene-specific that regulate the expression of other genes that are key to longevity. The UCLA study⁸ showed that DNA methylation is a predictor of ageing, predicting age in 14 000 tissue samples.

Because ageing is associated with an increased risk of morbimortality,⁹ and since life expectancy increases the number of elderly people proportionally, it should be important to establish a predictive model that allows us to measure the degree of fragility in the population, thus, becoming a key piece for health management.¹

Currently, there is not a standardized method to calculate precisely biological senescence. Several models have been proposed¹⁰ using multiple linear regression, principal

component analysis,¹¹ or the Klemera and Doubal's method.¹² However, none of them has generated a practical algorithm that can be applied to clinical practice.

Based on this evidence, we aimed to develop a predictive model to evaluate the degree of biological senescence based on the clinical and biological profile of the coronary patients.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study design

The current work was conducted within the framework of the CORDIOPREV study. Details of the trial have been provided in Clinicaltrials.gov (NCT00924937) and described in rationale and methods.¹³ In summary, the CORDIOPREV study is a prospective, randomized, single, blind, controlled trial including 1002 patients with coronary heart disease in secondary cardiovascular prevention, who had their last coronary event more than six months before enrolment. Patients were recruited from November 2009 to February 2012, mostly at the Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain, but other patients from other centres from the provinces of Jaen and Cordoba were also included. The protocol and all amendments were approved by the local ethics committees, all of which followed the Helsinki Declaration and good clinical practices.

For the present analysis, we selected those patients with the higher number of criteria for metabolic syndrome¹⁴ (≥ 4 criteria) in our population. The analyses were performed in those subjects on whom we had information on all variables included in the analysis: clinical, anthropometric, biomarkers and telomere length. In total, $n = 353$ patients of all included in the study. We show a flow diagram in Figure 1.

2.2 | Assessment of general variables

At the beginning and at the annual visits, several questionnaires were collected with socio-demographic data and different

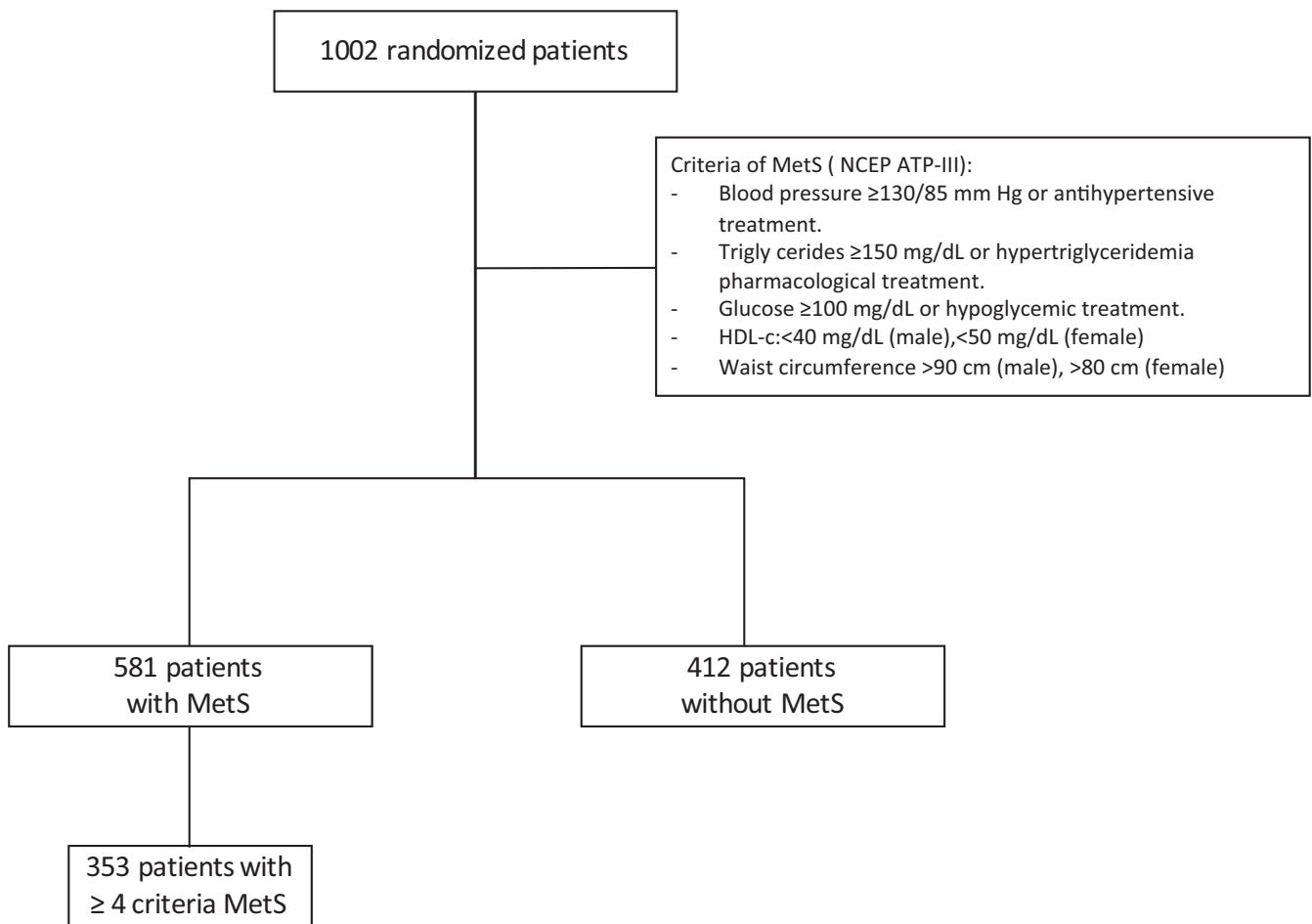


FIGURE 1 Flow diagram. Representation of the selection of patients included in the study. MetS, metabolic syndrome; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol

variables on lifestyle. Physical activity and leisure-time activity were assessed by the validated Spanish version of the Minnesota Leisure-Time Physical Activity Questionnaire.¹⁵ Weight and height measurements were performed by trained dietitians using calibrated scales (BF511 Body Composition Analyzer/Scale, OMRON) and a wall-mounted stadiometer (Seca 242, HealthCheck Systems), respectively. Body Mass Index (BMI) was calculated as weight per square meter (kg/m^2). Waist circumference was measured midway between the lowest rib and the iliac crest using an anthropometric tape.

During the initial assessment of the patients included in the study, the personal history of the participants, together with drugs and doses, were collected by the medical team.

2.3 | Laboratory measurements

Biochemical measurements were collected from the participants after a 12 hours overnight fast at the beginning of the study and once a year during the follow-up period. In the present work, we have used the information about biochemical parameters obtained at the basal time. Venous blood for insulin,

glucose, lipid and lipoprotein analysis was obtained from the antecubital vein and collected into EDTA collection tubes and serum separated from the red cells by centrifugation at 1500 g for 15 minutes at 4°C and immediately frozen at -80°C .

Serum parameters were measured in Architect® c-16000 analyzers (Abbott) using spectrophotometric techniques (enzymatic colorimetric methods): the hexokinase method for glucose, and oxidation-peroxidation for total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL-C) and triglycerides (TG). Low-density lipoprotein (LDL-C) concentration was calculated by the Friedewald Equation.¹⁶ The hs-C-Reactive Protein (hs-CRP) was determined by high-sensitivity ELISA (BioCheck®, Inc). The HOMA-IR index (fasting glucose (mg/dL) \times fasting insulin (mU/L)/22.5) is regarded as a simple, inexpensive and reliable surrogate measure of insulin resistance.

2.4 | Determination of inflammatory parameters

Plasma or serum concentrations of IL-6, IL-1 β , TNF- α , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), adiponectin,

TABLE 1 Baseline characteristics of the population

	Nonbiological senescence	Biological senescence	<i>P</i>
N	279	74	
Age (years)	58.6 ± 8.5	60.2 ± 8.2	.13
BMI (kg/m ²)	31 ± 4	31 ± 5	.54
Waist circumference (cm)	104.9 ± 11.8	107.2 ± 12	.13
SBP (mmHg)	139 ± 21	139 ± 22	.97
DBP (mmHg)	78 ± 11	79 ± 10	.48
HbA1c (%)	6.5 ± 1.1	6.6 ± 1.1	.75
Glomerular filtration (mL/min)	94 ± 20	92 ± 23	.34
Total cholesterol (mg/dL)	160 ± 32	151 ± 29	.034*
HDL-C (mg/dL)	43 ± 10	41 ± 9	.94
Triglycerides (mg/dL)	133 ± 69	131 ± 66	.78
LDL-C (mg/dL)	89 ± 26	83 ± 23	.053
hs-CRP (mg/dL)	3.1 ± 3.9	2.6 ± 2.9	.37
HOMA-IR	3.5 ± 5.9	3.9 ± 5.8	.6
Total glutathione (mm/mg.Hb) ×10 ⁻³	12.3 ± 1.5	12.5 ± 1.5	.48
Reduced glutathione(GSH) (mm/mg.Hb) ×10 ⁻³	10.7 ± 2.3	10.6 ± 2.3	.87
Oxidized glutathione (GSSG) (mm/mg.Hb)	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.002	.31
Ratio GSH/GSSG (%)	15.4 ± 21.1	15.1 ± 19	.91
Peroxidated glutathione (GPx) (UI/mg.Hb) ×10 ⁻³	33.9 ± 23.5	31.6 ± 17.8	.42
Catalase (U.Activity/mg.Hb) ×10 ⁻³	3.53 ± 2.1	4.18 ± 2.9	.034*
Superoxide dismutase (SOD) (U.Activity/mg.Hb)	2.4 ± 1	2.6 ± 1.1	.049*
Carbonylated proteins (Pc) (nm/mL)	0.032 ± 0.01	0.031 ± 0.008	.34
Plasma nitric oxide (NOx) (µM/L)	47.1 ± 16.7	46.6 ± 19	.83
Lipid peroxidation products (LPO) (µM/L)	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.5	.58
MCP1 (pg/mL)	211.1 ± 106.5	217.1 ± 114.9	.67
TNF-α (pg/mL)	12.8 ± 5.9	12.9 ± 7.2	.92
IL-6 (pg/mL)	6.8 ± 4.1	6.7 ± 3.8	.89
IL-1β (pg/mL)	1.2 ± 0.6	1.4 ± 1.3	.033*
Adiponectin (µg/mL)	6.7 ± 4.3	6.5 ± 4.5	.76
Resistin (ng/mL)	7.4 ± 3.7	8.7 ± 4	.007*
Leptin (ng/mL)	19.3 ± 11.8	22.9 ± 14.4	.029*
Residence (2 groups)	0.62 ± 0.487	0.59 ± 0.495	.686
Highest general education (4 groups)	1.20 ± 0.821	1.25 ± 0.795	.878
Monthly income (3 groups)	0.87 ± 0.704	0.93 ± 0.631	.209
Time physical activity (meter.min.day)	204.79 ± 13.383	185.97 ± 22.342	.508

Note: Highest general education 4 groups: higher education, secondary education, primary education, none; Monthly income (euros per month) 3 groups: >1800, 900-1800, <900; Residence 2 groups: rural, urban

Values expressed as mean ± SEM. Variables were calculated using one-way ANOVA analysis and Chi-square test.

Abbreviations: BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL-c, high-density lipoprotein; LDL-c, Low-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL-6, interleukin 6; IL-1β, interleukin 1 beta; TNF-α, tumor necrosis factor alpha, MPC-1, monocyte chemoattractant protein-1.

**P* < .05.

Drugs	Nonbiological senescence	Biological senescence	<i>P</i>
Beta-blocker	78.9%	80.6%	.707
Angiotensin-converting-enzyme inhibitor	53.8%	54.2%	.375
Angiotensin receptor blockers	25.1%	26.4%	.124
Diuretics	34.8%	29.2%	.376
Calcium channel blockers	18.6%	22.2%	.486
Lipids-lowering drugs	91.4%	87.5%	.275

Note: Values expressed as percentage. Variables were calculated using Chi-square test.

Lipids-lowering drugs include statins, ezetimibe, fibrates and omega-3 fatty acids.

**P* < .05.

TABLE 2 Comparison of drugs between subgroups

an overall C-statistic.²¹ This C-statistic is analogous to the area-under-the-receiver-operator-characteristic curve. For internal validation of the model, the degree of over-optimism resulting from the model assessment on the same data on which it was developed was estimated using bootstrap resampling of the original set (1000 randomized samples) as recommended by Collins GS et al.²¹

3 | RESULTS

3.1 | Characteristics of the study participants

The baseline characteristics of the patients are shown in Table 1. Statistically significant differences (*P* < .05) between both groups (Biological senescence vs. Nonbiological senescence) were found higher levels for catalase, SOD, IL-1 β , resistin and leptin in the biological senescence group. Total cholesterol levels were lower in the biological senescence group. In Table 2, we show the comparison of drugs between both groups, finding no statistically significant differences in any of them.

3.2 | Predictors of biological senescence risk

At the baseline of the study, 74 (20%) patients in the cohort had biological senescence according to the defined criteria (RTL \leq 0.7629). Figure 2 shows predictors of diagnosis of biological senescence in the different models and their Harrell's C index. Based on those results, we selected the enhanced model as the model with more efficiency. Thus, biological senescence risk can be calculated as $P = 1 / (1 + e^{(-\beta X - 5.3970)})$, where β is the regression coefficient and X is the level for each risk factor. The cut-off point with the better sensibility (*S* = 0.7) and specificity (*E* = 0.74) was 0.233.

3.3 | Internal validation

The bootstrap resampling of the original set (1000 randomized samples) showed a degree of over-optimism of 0.08 for the enhanced model, which represents the deviation from the mean of the standard error of the estimation in these 1000 samples (Table 3).

4 | DISCUSSION

We have developed and tested three statistical models to calculate the degree of biological senescence in patients with established cardiovascular disease. They were built using the information on biomarkers of cardiovascular disease risk, inflammatory response and oxidative stress. Interestingly, we made these models on a scalable design to provide different approaches depending on the variables available for each patient. Of all of them, the enhanced model, that include age, gender, body mass index, waist circumference, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, heart rate, HDL-cholesterol, fasting triglycerides, hsCRP and HOMA-IR, catalase, SOD, LPO, IL-1 β and resistin as independent variables, would be the most cost-effective in the calculation of ageing, by the results obtained and the number of variables used.

Previous studies have shown that shorter LTL was associated with cardiovascular disease.²² In the West of Scotland Primary Prevention Study, performed in patients with coronary heart disease compared to healthy individuals, it was found that people with shorter LTL had a higher risk of developing coronary disease than people with longer LTL; this increase was attenuated if they were treated with statins.²³ Data from the Heart and Soul Study, carried out in 780 patients with stable coronary artery disease, showed that a shortening of LTL was associated with an increase in mortality from all causes in those patients, which cannot be explained only by classical risk markers.²⁴ Also, a large-scale

FIGURE 2 ROC curve of predictive models. Predictors of diagnosis of biological senescence in the different models and their Harrell's C index (AUC ROC)

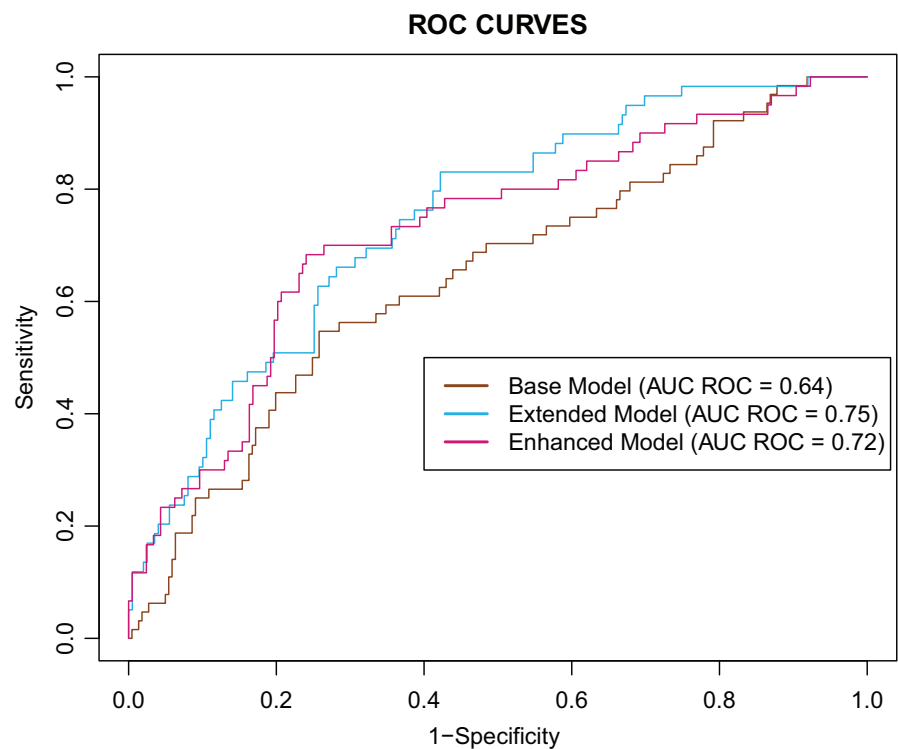


TABLE 3 Summary of internal validation with the bootstrap resampling of the original set

Model	Apparent "in-sample" AUC	Optimism	Bootstrapped AUC
Base	0.6442308	0.07926560	0.5649652
Extended	0.7469551	0.13848944	0.6084657
Enhanced	0.7249199	0.08595089	0.6389690

Abbreviation: AUC, area under the curve.

observational study, including more than 80 000 patients with ischemic heart disease,²⁵ established short length of telomeres as a risk factor for coronary heart disease.

In our population, patients with biological senescence showed higher levels of inflammatory parameters and oxidative stress markers, such as IL-1 β , resistin, leptin, SOD activity and catalase. Chronic inflammation explains multiple diseases concurrently and it is related to ageing.²⁶ In pro-inflammatory states, macrophages release IL-1 β and IL-6, both related to telomere shortening.²⁷ In the analysis of 87 of the 190 participants of The Harvard Boilermakers Longitudinal Study²⁸ an association was found between inflammatory parameters and the decrease in telomere length, especially with hsCRP. However, in that study, no significant relationships were found with interleukins, which may be due to the number of patients or the low variability in the plasma concentrations of these biomarkers.

Central obesity is another risk factor for multiple diseases, including cardiovascular disease.²⁹ Leptin is a

hormone produced mostly by adipocytes that regulate appetite. In previous studies, it has been observed that leptin is elevated in patients with obesity. This is due to a resistance of the receptor that produces lower sensitivity to this hormone resulting in weight gain.³⁰ An analysis in seven independent cohorts with a total of 11 448 participants³¹ where they analysed the relationship between telomere length with leptin and adiponectin concluded that elevated leptin levels were associated with short RLT, similar to the findings of our analysis.

Resistin is a pro-inflammatory adipokine, initially related to insulin resistance. However, the mechanism is unknown in humans due to the lack of a specific receptor. Animal studies suggest a role in the hypothalamus-pituitary, involving the reproductive organs and the placenta.³² We hypothesize that the positive association observed between resistin and biological senescence could be related to the higher pro-inflammatory state of our population.

It is known that patients with increased waist circumference have been associated with telomeric shortening.³³ However, we did not observe statistically significant associations. This could be explained by the characteristics of the patients in our study, where the patients were mainly obese in both groups.

On the other hand, in our analysis, we have observed that patients with biological ageing have a higher activity of SOD and catalase in response to oxidative stress. In this situation, cells defend themselves with the release of antioxidant enzymes, such as SOD, catalase and GPx, protecting it against free radicals that are produced by metabolism.³⁴ Along these

lines, we have described previously, in metabolic syndrome patients included in the LIPGENE study, that the shorter telomere length, the higher the degree of oxidative stress, which leads to increased plasma activity of antioxidant enzymes (GPx, SOD).³⁵

Currently, several models have been developed to predict the risk of developing cardiovascular disease, such as the Framingham risk score,^{36,37} systematic coronary risk evaluation (SCORE),³⁸ Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM)³⁹; and also studies that relate gender to telomere length, such as the Gardner⁴⁰ meta-analysis, or the 110 266 cohort of the Lapham⁴¹ study, in which, in addition to relating it to gender, also relates it to age. However, there is no model for the prediction of ageing in patients with cardiovascular pathology that allows us to jointly analyse clinical, inflammatory and oxidative parameters.

Therefore, our results provide a new tool for the management of patients with coronary disease, adding the calculation of biological ageing to known factors such as hypertension, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, obesity and smoking. Our predictive model will evaluate the degree of ageing of a person, and thus establish more specific and expert recommendations that allow improving the quality of life of patients and optimizing healthcare expenditure. At the same time, it allows us to analyse the interaction of telomere length with inflammation and oxidative stress. This association was already described by Tian,³ which proposed a decline in the antioxidant capacity as an important factor accelerating the attrition of telomeres in premature coronary patients. However, it remains uncertain whether telomere shortening is a cause of cardiovascular disease or merely a consequence.⁴² The strength of our study is that it addresses an important topic that will contribute to more accurate identification of biological senescence. However, although we have implemented an internal validation, the generalizability of our results should be investigated in other populations to validate the proposed model. On the other hand, another limiting factor of the study could be not having determined other senescence markers proposed in the literature (epigenetic clock, senescence markers and DNA methylation).⁷ However, in the present work we have decided to highlight the effect that oxidative stress and inflammation markers may have on the degree of telomeric shortening. Sample size could be also a limiting factor. This should be explained as this work is a sub-analysis inside the CORDIOPREV study, where the identification of biological senescence was not a primary endpoint. However, as far as we know, the models we explored here are the first to be proposed for the explanation of the biological senescence process. The CORDIOPREV study is a still open trial, once completed, it could be considered to add incidence data for new cardiovascular events to our subpopulation.

In summary, these predictive models allow us to analyse the degree of biological senescence in patients with high cardiovascular risk and may establish a personalized treatment for optimal control based on the results.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the EASP (Escuela Andaluza de Salud Publica), Granada, Spain, which performed the randomization process of this study.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

AMO-M., JF A-D., P. P-M. and J.L-M. involved in conception and design of the study. O.R-Z., AC, G.Q-N., MPC, E.Y-S. and J.L-M. involved in provision of study materials or subjects. AC, G.Q-N., O.R-Z., MMM and E.Y-S. involved in collection and assembly of data. AMO-M., JFA-D, and J.D-L involved in analysis and interpretation of the data. JF A-D. and J.D-L. involved in statistical expertise. AMO-M, JFA-D. and P.P-M. involved in drafting of the manuscript. AMO-M, JM O., J.L-M. and P. P-M involved in critical review of the manuscript for important intellectual content. All authors were involved in writing the paper and had final approval of the submitted and published versions.

ORCID

Ana M. Ortiz-Morales  <https://orcid.org/0000-0002-5729-0104>

Juan F. Alcalá-Díaz  <https://orcid.org/0000-0002-4572-3611>

REFERENCES

1. Writing Group Members, Mozaffarian D, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):e38-e360.
2. Rehkopf DH, Needham BL, Lin J, et al. Leukocyte telomere length in relation to 17 biomarkers of cardiovascular disease risk: a cross-sectional study of US adults. *PLoS Med*. 2016;13(11):e1002188.
3. Tian R, Zhang L-N, Zhang T-T, et al. Association between oxidative stress and peripheral leukocyte telomere length in patients with premature coronary artery disease. *Med Sci Monit*. 2017;23:4382-4390.
4. Mather KA, Jorm AF, Parslow RA, Christensen H. Is telomere length a biomarker of aging? A review. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011;66(2):202-213.
5. Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, Butterworth AS, Thompson A, Willeit P. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014;349:g4227.
6. Lamprokostopoulou A, Moschonis G, Manios Y, et al. Childhood obesity and leucocyte telomere length. *Eur J Clin Invest*. 2019;49(12):e13178.
7. Sen P, Shah PP, Nativio R, Berger SL. Epigenetic mechanisms of longevity and aging. *Cell*. 2016;166(4):822-839.
8. Horvath S. Erratum to: DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2015;16:96.

9. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005;6(8):611-622.
10. Jia L, Zhang W, Chen X. Common methods of biological age estimation. *Clin Interv Aging.* 2017;12:759-772.
11. Zhang W-G, Zhu S-Y, Bai X-J, et al. Select aging biomarkers based on telomere length and chronological age to build a biological age equation. *Age (Dordr).* 2014;36(3):9639.
12. Klemmera P, Doubal S. A new approach to the concept and computation of biological age. *Mech Ageing Dev.* 2006;127(3):240-248.
13. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, 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.
14. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation.* 2004;109(3):433-438.
15. Elosua R, Garcia M, Aguilar A, Molina L, Covas MI, Marrugat J. Validation of the Minnesota Leisure time physical activity questionnaire in Spanish women. Investigators of the MARATDON Group. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32(8):1431-1437.
16. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.
17. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-121.
18. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126.
19. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(10):e47.
20. Gomez-Delgado F, Alcalá-Díaz JF, Garcia-Rios A, et al. Polymorphism at the TNF-alpha gene interacts with Mediterranean diet to influence triglyceride metabolism and inflammation status in metabolic syndrome patients: from the CORDIOPREV clinical trial. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(7):1519-1527.
21. Harrell FE Jr, Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med.* 1996;15(4):361-387.
22. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 2003;361(9355):393-395.
23. Brouillette SW, Moore JS, McMahan AD, et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet.* 2007;369(9556):107-114.
24. Farzaneh-Far R, Cawthon RM, Na B, Browner WS, Schiller NB, Whooley MA. Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(7):1379-1384.
25. Scheller Madrid A, Rode L, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Short telomere length and ischemic heart disease: observational and genetic studies in 290 022 individuals. *Clin Chem.* 2016;62(8):1140-1149.
26. Larochette V, Miot C, Poli C, et al. IL-26, a Cytokine with roles in extracellular DNA-induced inflammation and microbial defense. *Front Immunol.* 2019;10:204.
27. Lopizzo N, Tosato S, Begni V, et al. Transcriptomic analyses and leukocyte telomere length measurement in subjects exposed to severe recent stressful life events. *Transl Psychiatry.* 2017;7(2):e1042.
28. Wong JY, De Vivo I, Lin X, Fang SC, Christiani DC. The relationship between inflammatory biomarkers and telomere length in an occupational prospective cohort study. *PLoS One.* 2014;9(1):e87348.
29. García-Calzón S, Gea A, Razquin C, et al. Longitudinal association of telomere length and obesity indices in an intervention study with a Mediterranean diet: the PREDIMED-NAVARRA trial. *Int J Obes (Lond).* 2014;38(2):177-182.
30. Wang MY, Orzi L, Ravazzola M, Unger RH. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(50):18011-18016.
31. Broer L, Raschenberger J, Deelen J, et al. Association of adiponectin and leptin with relative telomere length in seven independent cohorts including 11 448 participants. *Eur J Epidemiol.* 2014;29(9):629-638.
32. Estienne A, Bongrani A, Reverchon M, et al. Involvement of novel adipokines, chemerin, visfatin, resistin and apelin in reproductive functions in normal and pathological conditions in humans and animal. *Models. Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4431.
33. Zgheib NK, Sleiman F, Nasreddine L, et al. Short telomere length is associated with aging, central obesity, poor sleep and hypertension in lebanese individuals. *Ageing Dis.* 2018;9(1):77-89.
34. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40.
35. González-Guardia L, Yubero-Serrano EM, Rangel-Zuñiga O, et al. Influence of endothelial dysfunction on telomere length in subjects with metabolic syndrome: LIPGENE study. *Age (Dordr).* 2014;36(4):9681.
36. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998;97(18):1837-1847.
37. D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2008;117(6):743-753.
38. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J.* 2003;24(11):987-1003.
39. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation.* 2002;105(3):310-315.
40. Gardner M, Bann D, Wiley L, et al. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol.* 2014;51:15-27.
41. Lapham K, Kvale MN, Lin J, et al. Automated assay of telomere length measurement and informatics for 100 000 subjects in the Genetic Epidemiology Research on Adult Health and Aging (GERA) cohort. *Genetics.* 2015;200(4):1061-1072.
42. De Meyer T, Nawrot T, Bekaert S, De Buyzere ML, Rietzschel ER, Andres V. Telomere length as cardiovascular aging biomarker: JACC review topic of the week. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(7):805-813.

How to cite this article: Ortiz-Morales AM, Alcalá-Díaz JF, Rangel-Zuñiga OA, et al. Biological senescence risk score. A practical tool to predict biological senescence status. *Eur J Clin Invest.* 2020;00:e13305. <https://doi.org/10.1111/eci.13305>

EL COMITÉ CIENTÍFICO DEL **40º CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MEDICINA INTERNA (SEMI) / 19º CONGRESO DE LA SOCIEDAD CATALANO-BALEAR DE MEDICINA INTERNA (SCBMI)**, CELEBRADO LOS DÍAS 27, 28 Y 29 DE NOVIEMBRE DE 2019 EN BARCELONA, CERTIFICA QUE:

LOS DRES. A. ORTIZ-MORALES, J. ALCALÁ-DÍAZ, F. GÓMEZ-DELGADO, A. LEON-ACUÑA, A. GONZALEZ-REQUERO, A. ARENAS DE LARRIVA, J. LÓPEZ-MIRANDA, P. PÉREZ-MARTÍNEZ

HAN PRESENTADO EN DICHO CONGRESO LA COMUNICACIÓN ORAL RV-022 **"SCORE ENVEJECIMIENTO: UNA HERRAMIENTA PRÁCTICA PARA PREDECIR EL ESTADO DE SENESCENCIA BIOLÓGICA"**.



DR. RICARDO GÓMEZ HUELGAS
PRESIDENTE DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE MEDICINA INTERNA (SEMI)



DRA. ROSER SOLANS I LAQUÉ
PRESIDENTA EJECUTIVA DE LOS
COMITÉS CIENTÍFICO Y ORGANIZADOR DEL 40º
CONGRESO NACIONAL DE LA SEMI /19º
CONGRESO DE LA SCBMI

BARCELONA, 29 DE NOVIEMBRE DE 2019



Junta de Andalucía

Consejería de Salud y Familias

FUNDACIÓN PROGRESO Y SALUD

D. Francisco Javier Montero Plata, con DNI 74641190-A, en nombre y representación de la Oficina de Transferencia de Tecnología del Sistema Sanitario Público de Andalucía (OTT-SSPA), en su calidad de Director de la misma

CERTIFICA

Que **D. Ana María Ortiz Morales**, con DNI 14625976T, cuenta con los siguientes resultados en el ámbito de la transferencia de resultados:

- Expediente: FIBICO-17007
Título: NUTRI-CLOCK
Nº de solicitud: RPI201799901594741
Fecha de presentación: 10/05/2017
Inventores: José López Miranda, Pablo Pérez Martínez, Elena M^a Yubero Serrano, Juan Francisco Alcalá Díaz, Francisco Javier Delgado Lista, Ezequiel Herruzo Gómez, Oriol Alberto Rangel Zúñiga, Ana María Ortiz Morales, Ana León Acuña, Andreea Corina Baba, Javier López Moreno.
Solicitantes: Servicio Andaluz de Salud, Universidad de Córdoba, CIBER
Ámbito: Registro de Propiedad Intelectual
Estado: Solicitado

En Sevilla, a 05 de noviembre de 2020

Fdo. D. Javier Montero Plata
Director de la OTT-SSPA



