

Tesis Doctoral

**Proteína S-Klotho como biomarcador del proceso de envejecimiento:
validación analítica y efecto del ejercicio físico sobre sus niveles
circulantes en adultos jóvenes sanos**



PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

2024

Andrea Espuch Oliver

Directores

Francisco J. Amaro Gahete

Tomás de Haro Muñoz

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Proteína S-Klotho como biomarcador del proceso de envejecimiento:
validación analítica y efecto del ejercicio físico sobre sus niveles
circulantes en adultos jóvenes sanos**

Andrea Espuch Oliver

Directores de la Tesis Doctoral

Francisco J. Amaro Gahete

Tomás de Haro Muñoz

MD, PhD

PhD

Profesor Titular de Universidad

Director UGC de Laboratorios

Universidad de Granada

Hospital Universitario Clínico San Cecilio

Granada, marzo de 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Andrea Espuch Oliver
ISBN: 978-84-1195-375-7
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92954>



Dr. Francisco J. Amaro Gahete

Profesor Titular de Universidad

Departamento de Fisiología

Facultad de Medicina

Universidad de Granada

FRANCISCO J. AMARO GAHETE

PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Proteína S-Klotho como biomarcador del proceso de envejecimiento: validación analítica y efecto del ejercicio físico sobre sus niveles circulantes en adultos jóvenes sanos” que presenta **D^a. Andrea Espuch Oliver** al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizado bajo mi dirección durante los años 2017-2024, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedor del Título de Doctor, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. Francisco J. Amaro Gahete

Granada, 19 de marzo de 2024



Dr. Tomás De Haro Muñoz

Director UGC De Laboratorios

Hospital Universitario Clínico San Cecilio

TOMÁS DE HARO MUÑOZ, DIRECTOR UGC DE LABORATORIOS DEL
HOSPITAL UNIVERSITARIO CLÍNICO SAN CECILIO

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Proteína S-Klotho como biomarcador del proceso de envejecimiento: validación analítica y efecto del ejercicio físico sobre sus niveles circulantes en adultos jóvenes sanos” que presenta **D^a. Andrea Espuch Oliver** al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizado bajo mi dirección durante los años 2017-2024, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedor del Título de Doctor, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. Tomás De Haro Muñoz

Granada, 19 de marzo de 2024



La doctoranda D^a. **Andrea Espuch Oliver** y los directores de la tesis D. Francisco J. Amaro Gahete y D. Tomás De Haro Muñoz:

Garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores al ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Directores de la Tesis

Doctoranda

Fdo. Francisco J. Amaro Gahete

Fdo. Andrea Espuch Oliver

Fdo. Tomás De Haro Muñoz

Granada, 22 de marzo de 2024

TABLA DE CONTENIDOS

PROYECTOS Y FINANCIACIÓN	15
ABREVIATURAS.....	17
RESUMEN	20
ABSTRACT.....	22
INTRODUCCIÓN.....	24
I. ENVEJECIMIENTO	26
1. ENVEJECIMIENTO: CONCEPTOS CLAVE.....	26
2. ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL.....	32
3. ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO	41
II. KLOTHO COMO AGENTE SUPRESOR DEL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO	87
1. APROXIMACIÓN CONCEPTUAL	87
2. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE KLOTHO	99
3. KLOTHO COMO BIOMARCADOR PRONÓSTICO	108
III. EJERCICIO FÍSICO, ENVEJECIMIENTO Y KLOTHO.....	110
1. PREFACIO	110
2. KLOTHO EN RESPUESTA A EJERCICIO: ¿INFLUYE EL ESTRÉS OXIDATIVO?	113
3. EL ENTRENAMIENTO FÍSICO ESTIMULA KLOTHO.....	115
4. KLOTHO COMO MIMÉTICO DEL EJERCICIO FÍSICO	117
5. KLOTHO COMO OBJETIVO EN CIENCIAS DEL DEPORTE Y MEDICINA.....	118
IV. TEORÍA DE LOS VALORES DE REFERENCIA	120
1. ORIGEN DE LOS VALORES DE REFERENCIA	120
2. CONCEPTO ACTUAL DE LOS VALORES DE REFERENCIA	121
3. ÁMBITO DE APLICACIÓN DE LOS VALORES DE REFERENCIA.....	123

4.	DEFINICIONES Y CONCEPTOS.....	124
5.	ESTABLECIMIENTO DE LOS VALORES DE REFERENCIA. MÉTODO DIRECTO.....	128
	OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	140
I.	HIPÓTESIS GENERAL	142
II.	OBJETIVO GENERAL	142
III.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	142
1.	ESTUDIO I.....	142
2.	ESTUDIO II.....	142
	METODOLOGÍA	144
I.	ESTUDIO I.....	147
II.	ESTUDIO II.....	148
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	150
I.	ESTUDIO I.....	152
1.	INTRODUCCIÓN	153
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	155
3.	RESULTADOS.....	158
4.	DISCUSIÓN	162
5.	CONCLUSIÓN	167
II.	ESTUDIO II.....	168
1.	INTRODUCCIÓN	169
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	171
3.	RESULTADOS.....	177
4.	DISCUSIÓN	182
5.	CONCLUSIÓN	184

CONCLUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS	186
I. CONCLUSIÓN GENERAL.....	187
II. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS.....	188
1. ESTUDIO I.....	188
2. ESTUDIO II.....	188
III. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	189
REFERENCIAS	190
CURRICULUM VITAE.....	256
AGRADECIMIENTOS	262

PROYECTOS Y FINANCIACIÓN

La presente tesis doctoral se ha realizado bajo el auspicio del proyecto ACTIBATE, el cual ha sido financiado por las siguientes entidades:

- Ministerio de Economía y Competitividad (PTA 12264) y Fondo de Investigación Biosanitaria para la Salud (PI13/01393).
- Retos de la Sociedad (DEP2016-79512-R), Fondos de la Unión Europea (FEDER).
- Redes temáticas de investigación cooperativa RETIC (RED SAMID RD16/0022).
- Universidad de Granada, Plan Propio de Investigación 2016 y 2021-Acciones de Excelencia: Unidad de Excelencia de Ejercicio Nutrición y Salud (UCENS).

ABREVIATURAS

1-RM: Una Repetición Máxima

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNm: Metilación del ADN

ADNt: ADN telomérico no codificante

ANCOVA: Análisis de Covarianza

ANOVA: Análisis de la Varianza

AFAR: Federación Estadounidense

para la Investigación del

Envejecimiento

ALT: Alargamiento Alternativo de los

Telómeros

ApoE: Apolipoproteína E

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNcirc: ARN circulares

ARNlnc: ARN largo no codificante

ARNm: ARN mensajero

ARNnc: ARN no codificante

CLSI: Clinical and Laboratory

Standards Institute

CONSORT: Consolidated Standards of

Reporting Trials

CPP: Calciproteicas

CV: Coeficiente de Variación

ECG: Electrocardiograma.

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción

Ligado a Enzimas

Ej-Vig: Programa de entrenamiento

concurrente a intensidad vigorosa

Ej-Mod: Programa de entrenamiento

concurrente a intensidad moderada

FCR: Frecuencia Cardíaca de Reserva

FGF: Factor de Crecimiento de

Fibroblastos

FGFR: Receptores del Factor de

Crecimiento de Fibroblastos

FOXO: Factores de Transcripción

FoxO Forkhead

KL: Klotho

GPX1: Glutación peroxidasa 1

GWAS: Genome Wide Association

Studies

IFCC: International Federation of

Clinical Chemistry and Laboratory

Medicine

IGF1: Factor de Crecimiento similar a

la Insulina 1

IGF-1R: Receptor de IGF-1

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-6: Interleucina-6

IL-12a: Interleucina-12

IMC: Índice De Masa Corporal

INE: Instituto Nacional de Estadística

IP-IT: Inmunoprecipitación-

inmunotransferencia

LPS: Lipopolisacárido

miARN: Micro ARN

MnSOD: Superóxido dismutasa de

manganeso

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NGS: Next-Generation Sequencing

NOS: Óxido Nítrico Sintetas

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONU: Organización de las Naciones Unidas

P53: Proteína reguladora del ciclo celular

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PPAR- γ : Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas- γ

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

S-Klotho: Proteína Klotho soluble

SADS: Distensión de Satélites asociada a la Senescencia

SAHF: Focos Heterocromáticos Asociados a la Senescencia

SASP: Senescence-Associated Secretory Phenotype

SOD: Superóxido Dismutasa

SR: Senescencia Replicativa

TERC: TElomerase Reverse Catalitic subunit

TERT: TElomerase Reverse Transcriptase

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa

TRPV5: Canal de Calcio Receptor Potencial Vallinoide-5

UNGA: United Nations General Assembly - Asamblea General de las Naciones Unidas

VB: Variabilidad Biológica

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

ANTECEDENTES

La proteína Klotho es un robusto predictor del envejecimiento y la esperanza de vida. El proceso de envejecimiento está asociado a niveles reducidos de S-Klotho en pacientes, pero no hay valores de referencia específicos disponibles para cohortes numerosas de individuos sanos según la edad y el sexo. Además, aún se desconoce si el ejercicio puede mejorar los niveles de Klotho soluble (S-Klotho) en adultos jóvenes y si esta mejora hipotética depende de la intensidad del ejercicio.

OBJETIVO E HIPÓTESIS

El objetivo general de la Tesis Doctoral es establecer los valores de referencia de S-Klotho en adultos sanos de 18 a 85 años (Estudio I) e investigar los efectos de un programa de ejercicio supervisado de 24 semanas sobre los niveles de S-Klotho en adultos jóvenes (Estudio II). Hipotetizamos que los niveles de S-Klotho se verán afectados por la edad y el sexo en individuos sanos del sur de España (Estudio I) y que un programa de ejercicio físico supervisado de 24 semanas puede optimizar los niveles de S-Klotho en adultos jóvenes (Estudio II).

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio I: En este estudio transversal analítico, se incluyeron un total de 346 voluntarios sanos (143 hombres) de 18 a 85 años. Las muestras se procesaron según un protocolo estándar, y los niveles de S-Klotho se determinaron mediante un ensayo ELISA.

Estudio II: Un total de 144 adultos jóvenes (~66% mujeres), de 18 a 25 años, participaron en este ensayo controlado aleatorizado con 3 grupos (duración 24 semanas):

(i) programa de entrenamiento concurrente a intensidad vigorosa, (ii) programa de entrenamiento concurrente a intensidad moderada y un (iii) grupo de control. Se tomaron muestras de sangre antes y después de la intervención y se determinaron apropiadamente los niveles de S-Klotho.

RESULTADOS

Estudio I: Los adultos mayores fueron el grupo de edad que presentó los niveles más bajos de S-Klotho ($p < 0.01$), con una asociación negativa entre la edad y los niveles de S-Klotho ($p < 0.001$). No se observaron diferencias entre sexos.

Estudio II: No se observaron diferencias significativas entre grupos en función del tiempo sobre los niveles de S-Klotho en plasma ($p=0.497$).

CONCLUSIÓN

En resumen, los principales hallazgos de la Tesis Doctoral ponen de manifiesto que los niveles de S-Klotho están especialmente disminuidos en adultos mayores en comparación con sus contrapartes jóvenes, independientemente del sexo, y que un programa de entrenamiento concurrente supervisado de 24 semanas no induce cambios significativos en S-Klotho, independientemente de la intensidad del ejercicio, en adultos jóvenes.

ABSTRACT

BACKGROUND

The Klotho protein is a powerful predictor of the aging process and lifespan. Aging process is related with lowered circulating S-Klotho in non-healthy individuals, but no specific reference values across wide range ages are available for larger cohorts of healthy individuals by age and sex. Moreover, it still remains unknown whether exercise may improve S-Klotho levels in young adults and if this hypothetical enhancement depends on exercise intensity.

OBJETIVE AND HYPOTHESIS

The general objective of the Doctoral Thesis is to establish reference values for serum S-Klotho levels in healthy adults aged 18 to 85 years (Study I) and to investigate the effects of a 24-week supervised exercise program on S-Klotho levels in young adults (Study II). We hypothesize that S-Klotho levels would be affected by age and sex in healthy individuals from southern Spain (Study I) and that a 24-week supervised physical exercise program can optimize S-Klotho levels in young adults (Study II).

MATERIAL AND METHODS

Study I: In this analytical cross-sectional study, we included a total of 346 healthy volunteers (143 men) aged 18 to 85 years. Samples were processed according to a standard protocol, and S-Klotho levels were determined by an ELISA assay. Study II: A total of 144 young adults (~66% women), aged 18 to 25y, participated in this randomized controlled trial with 3 arms (duration 24 weeks): (i) concurrent training program at vigorous intensity, (ii) concurrent training program at moderate intensity, and (iii) a control group.

Blood samples were taken before and after the intervention and S-Klotho properly determined.

RESULTS

Study I: Senior adults were the age-group that presented the lowest S-Klotho levels ($p < 0.01$), with age showing a negative association with S-Klotho levels ($p < 0.001$). No differences between sexes were observed.

Study II: No significant differences across time were noted in S-Klotho plasma levels ($p = 0.497$). There was no time*group interaction in S-Klotho ($p > 0.7$).

CONCLUSION

In summary, the main findings of the Doctoral Thesis are that S-Klotho levels are especially decreased in elderly adults compared with their younger counterparts- regardless of sex-, and that a 24-week supervised concurrent exercise training does not induce significant changes on S-Klotho -independently of the exercise intensity- in young adults.

INTRODUCCIÓN

I. ENVEJECIMIENTO

1. ENVEJECIMIENTO: CONCEPTOS CLAVE

Según la Real Academia Española de la Lengua, el envejecimiento es la “acción y efecto de envejecer o envejecerse”, siendo el adjetivo de un ser vivo que envejece, “viejo”, esto es, “de edad avanzada” (1,2). La esperanza de vida varía significativamente dependiendo de diversos factores, como la región geográfica, las condiciones de vida, la disponibilidad de alimentos, las enfermedades y otros factores ambientales. Así, aunque la longevidad (definida como la duración o extensión de la vida de un individuo, especialmente en relación con la edad avanzada) (3) de todas las especies está determinada genéticamente, en ella influyen una serie de factores ambientales que llevan a que, en el ser humano, el concepto de “viejo” sea dinámico y esté fuertemente condicionado por cuestiones como el desarrollo y acceso sanitario, los avances tecnológicos y el crecimiento económico del área geográfica del individuo, entre otras.

La esperanza de vida en el mundo antiguo era considerablemente más baja que en la actualidad. No era lo mismo referirse a un “viejo” en el siglo IV a.C., donde en la Roma y Grecia antiguas la esperanza de vida era de 30 a 40 años, que en la sociedad actual, donde según los datos más recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2019, la esperanza de vida global al nacer se situaba en aproximadamente en 73 años, siendo incluso mayor en los países desarrollados, como España (83,6) y Japón (84,4) (4), países que se encuentran a la cabeza en términos de longevidad y esperanza de vida.

Existen numerosas definiciones, pero todas ellas tienden a confluir en considerar el envejecimiento como un proceso dinámico, multifactorial y multidimensional (5). A través del “Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud (2015)”, la OMS define

el envejecimiento desde un punto de vista biológico como “el resultado de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, que lleva a un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, a un mayor riesgo de enfermedad y, en última instancia, a la muerte” (6). Entonces, la vejez es una etapa más de la vida en la cual los síntomas del envejecimiento se vuelven más evidentes y pueden manifestarse en todas las esferas del desarrollo del individuo: físico, cognitivo, sexual y social.

Para comprender el término global de envejecimiento, hay que definir conceptos específicos para cada una de las vertientes que afectan a las capacidades y funciones del individuo. Así, podemos definir (7):

- Edad cronológica: tiempo transcurrido en años desde el nacimiento.
- Edad biológica: determinada por el grado de funcionamiento de los órganos y tejidos.
- Edad psicológica: depende de las competencias psico-cognitivas del individuo.
- Edad social: hace referencia al papel que juega dicho individuo en la sociedad en la que se desenvuelve.

Establecer la edad de comienzo de la ancianidad, definida por la Real Academia Española como “el último período de la vida ordinaria del ser humano” (8), es complicado, pues depende de múltiples factores individuales y ambientales. La OMS sitúa la edad cronológica de comienzo de lo que denomina “edad avanzada” en los 60 años. Sin embargo, incide en que los cambios que tienen lugar no son siempre lineales ni uniformes y, por lo tanto, la relación entre edad biológica y cronológica es más bien relativa (4). No es de extrañar, por tanto, que el concepto de “viejo” difiera enormemente dependiendo del momento histórico y la población en la que un individuo se desarrolla,

y no solamente de las edades cronológica y biológica (9). Tanto es así que, en la actualidad, existe una importante escasez de guías clínicas que fechen el comienzo de la ancianidad de manera categórica, siendo la tendencia a considerar al anciano de manera individualizada como aquella persona con una seria merma en sus capacidades y funciones básicas, con una elevada comorbilidad en enfermedades relacionadas con el envejecimiento y con una alta demanda de farmacoterapia (10). De manera general, los países desarrollados suelen situar la edad cronológica de ancianidad por encima de los 60 años, concretamente en torno a los 65 años, debido tanto a razones biológicas por un envejecimiento saludable como socioeconómicas. Así, el Instituto Nacional de Estadística (INE) español, define el “índice de envejecimiento” como el porcentaje de personas mayores de 64 años sobre la población menor de 16 años un año concreto (11).

Actualmente, el envejecimiento es un fenómeno global que tiene importantes consecuencias económicas, sociales y políticas. En un sentido comunitario, el envejecimiento poblacional es el resultado de un cambio estructural de la población que supone un descenso drástico de nacimientos y una prolongación de la esperanza de vida, que conlleva el aumento del porcentaje de personas ancianas en un grupo de población (12). En ese sentido, el informe de la OMS “*World Population Prospects 2022*” (4), pone de manifiesto que, en la actualidad, el número de personas mayores de 65 años supera al de niños menores de cinco años por primera vez desde 2018, siendo esta tendencia al alza. Se espera que para el año 2050 haya más del doble de personas mayores de 65 años que de niños menores de 5 a nivel mundial, unos 1600 millones de personas. Se muestra así que el ritmo de envejecimiento de la población ha experimentado una aceleración sin precedentes, lo que plantea un reto a todos los países ante tan dramático cambio demográfico, fundamentalmente en materia sanitaria y sociosanitaria.

Numerosas organizaciones han promovido medidas dirigidas a difundir formas de envejecimiento activo y saludable con el fin de convertir a su población anciana en un activo social y económico. La Asamblea General de las Naciones Unidas (UNGA, del inglés, *United Nations General Assembly*) aprobó en 1982 el “Plan de Acción Internacional de Viena sobre el Envejecimiento” y, el 14 de diciembre de 1990, designó el 1 de octubre “Día Internacional de las Personas de Edad” (13). Más recientemente, la UNGA declaró el periodo 2021-2030 como la “Década del Envejecimiento Saludable”, que tiene en su base la “Estrategia y Plan de Acción Mundiales de la OMS sobre el Envejecimiento” (14) y el “Plan de Acción Internacional de Madrid sobre el Envejecimiento” de la Asamblea de 2002 (15), y es un apoyo para el cumplimiento de la “Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible y de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas” (16) con objeto de dar respuesta a las oportunidades y desafíos del envejecimiento de la población en el siglo XXI.

En el contexto del envejecimiento de la población mundial y los grandes cambios demográficos acontecidos desde el siglo XX -debido a una transición demográfica caracterizada por una mejora en la atención médica y calidad de vida que ha conducido a una gran disminución de las tasas de mortalidad y, en menor medida, de natalidad, hasta la actualidad, donde la urbanización y el desarrollo económico han desempeñado un papel importante en el crecimiento acelerado de la población mundial- se han ido desarrollando nuevos términos como respuesta a la necesidad de promover una vejez más saludable, activa y satisfactoria para los individuos con una mayor esperanza de vida.

La primera definición al respecto se remonta a 1961, donde Havighurst describió el “envejecimiento exitoso” en términos de felicidad y satisfacción vital. Para él, las personas que presentan un envejecimiento exitoso están satisfechas, son activas, independientes y autosuficientes (17). En 1998, Rowe y Kahn, le dieron un carácter

multidimensional al término de “envejecimiento exitoso” y afirmaron que consta de 3 componentes: una baja probabilidad de enfermar y de presentar discapacidad, un alto funcionamiento cognitivo y físico y un alto compromiso con la vida (18).

La OMS propone en el año 1998 que el desarrollo en edades tempranas de hábitos y estilos de vida saludables, así como la prevención temprana de algunas enfermedades y discapacidades es clave para asegurar un envejecimiento saludable (19). Define este concepto como el proceso en que se optimizan las oportunidades de salud, participación y seguridad a fin de mejorar la calidad de vida de las personas a medida que envejecen. Posteriormente, en 2001, define el término de “envejecimiento activo” como el proceso en que se optimizan las oportunidades de salud, participación y seguridad a fin de mejorar la calidad de vida de las personas a medida que envejecen (20). Para ello, es importante no sólo el mantenimiento de la capacidad física, sino también la participación continua del individuo en aspectos sociales, económicos, culturales y cívicos de su comunidad. Así, el concepto de “envejecimiento saludable” que propuso la OMS fue sustituido por uno más general de “envejecimiento activo” que incluye, además de los indicadores de salud, aspectos psicológicos, sociales y económicos con un enfoque más amplio, a nivel comunitario, y teniendo en cuenta los aspectos culturales y las diferencias de género (21).

Cuestiones como la mortalidad, la esperanza de vida, el envejecimiento y en qué manera éste puede mitigarse o prevenirse, han mantenido en vilo a científicos e investigadores desde tiempos inmemoriales (22–24). El avance sin precedentes en el conocimiento científico sobre el envejecimiento que está teniendo lugar en la actualidad, permite responder en parte a estas cuestiones y viene suscitado principalmente por el gran cambio demográfico existente y las tendencias al alza en la esperanza de vida. Ambos suponen un desafío a medio y largo plazo para las administraciones de cada país, las cuales deben adoptar medidas y fomentar estilos de vida saludables y un envejecimiento

activo para ofrecer oportunidades a las personas mayores y sus familias y, con ello, contribuir al beneficio de la sociedad (25). Sin embargo, nada de esto es posible sin la consiguiente inversión en investigación en envejecimiento y salud.

2. ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL

Uno de los hechos más significativos del siglo XXI -por la transformación social que comporta- es el envejecimiento de la población mundial. Este envejecimiento es un hecho contrastado que se está produciendo en la mayoría de los países del mundo como consecuencia del incremento de la proporción de personas mayores de 60 años. De hecho, en 2020, el número de personas de 60 años o más superó al de niños menores de cinco años y se estima que una de cada seis personas en el mundo tendrá 60 años o más en 2030 (12). En números absolutos, se estima que, en todo el mundo, la población de 60 años o más pasará de 900 a 1400 millones, un aumento del 64% en 15 años (de 2015 a 2030), siendo Europa el continente más envejecido del mundo (4).

Todas y cada una de las cuatro megatendencias demográficas mundiales (i.e., crecimiento de la población, envejecimiento de la población, migración y urbanización) tienen implicaciones importantes para el desarrollo económico/social y para la sostenibilidad ambiental. Las proyecciones de población presentadas en 2022 por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en el *World Population Prospects* (4), describen dos de las cuatro megatendencias demográficas (crecimiento y envejecimiento de la población), además de otras tendencias clave tales como la fertilidad humana, la mortalidad/esperanza de vida y la migración internacional neta, todas ellas parte integral del desarrollo sostenible. Estos datos son clave para la monitorización del progreso global hacia el logro de los “Objetivos de Desarrollo Sostenible para 2030”. Entre las conclusiones del *World Population Prospects 2022*, destaca el envejecimiento sin precedentes de la población mundial y el aumento de la longevidad, siendo además la brecha entre países pobres y ricos cada vez menor. De hecho, en 2050, el 80% de las personas mayores vivirá en países de ingresos bajos y medianos (12). Por último, añadir

que la esperanza de vida alcanzó los 72,8 años en 2019, un aumento de casi 9 años desde 1990, siendo además la supervivencia femenina mayor en todos los países del mundo. Se proyecta que la longevidad promedio mundial ascenderá hasta alrededor de los 77,2 años en 2050, viéndose triplicado el número de personas mayores de 80 años y pasando de 143 millones en 2019 a 426 millones en 2050.

2.1. Crecimiento de la población

La población mundial continúa creciendo, aunque lo hace a un ritmo más lento que en cualquier otro momento desde 1950 (año en el que las Naciones Unidas comienzan a tener datos demográficos mundiales) debido a la reducción de los niveles de la fertilidad (26). Actualmente, nacen aproximadamente 140 millones de bebés cada año en todo el mundo. Las proyecciones de la ONU prevén que el número de nacimientos se mantenga relativamente constante hasta mediados de siglo, disminuyendo gradualmente a partir de entonces a menos de 126 millones de nacimientos anuales para 2100 (27). De este modo, si en 2019 se estimaba que la población mundial era de 7700 millones de personas, la proyección es de 9700 millones de personas en 2050 y 10400 millones en 2100. Hasta 2050, más de la mitad del aumento proyectado de la población mundial se concentrará en solo siete países de África e India (que superará a China como país más poblado del mundo en 2023).

Las predicciones ofrecidas por el *World Population Prospects* sobre el crecimiento de la población mundial se basan en datos históricos relativos a la transición demográfica que se ha desarrollado en todo el mundo durante los últimos dos siglos y, a su vez, vienen sustentadas en la teoría de la transición demográfica. Esta teoría, desarrollada para explicar los cambios demográficos durante la revolución industrial, sigue estando vigente hoy en día, a pesar de sus limitaciones. Brevemente, establece que las sociedades que

experimentan la modernización progresan desde un régimen premoderno (o preindustrial) de alta fecundidad y alta mortalidad a uno posmoderno (o posindustrial) en el que ambas son bajas (28,29). La teoría de la transición demográfica predice que los niveles de fertilidad en el África subsahariana seguirán disminuyendo a medida que la región continúe progresando en múltiples dimensiones del desarrollo económico y humano, incluidas reducciones en la mortalidad infantil, mayores niveles de educación, igualdad de género y empoderamiento de las mujeres, retraso en la edad para contraer matrimonio, ampliación del acceso a los servicios de atención de la salud reproductiva (incluida la planificación familiar) y la urbanización, entre otros (27). Pese a ello, según las proyecciones de la ONU, los países del África subsahariana representarán más de la mitad del crecimiento de la población mundial entre 2019 y 2050.

Sin embargo, en contra de las predicciones de la ONU, una reciente publicación en *The Lancet* basada en modelos estadísticos robustos de fertilidad, mortalidad y migración, sitúa el pico de población mundial en la década de 2060, llegando hasta los 9700 millones de personas, momento a partir del cual la población irá decreciendo hasta los 8800 millones en el año 2100 debido a la disminución de la tasa de fecundidad en los países de alta fecundidad, en particular los del África subsahariana, impulsada en gran medida por las mejoras en el acceso a la educación femenina y a los anticonceptivos (30). Además, pronostican que 23 países, entre los que se incluye España, tendrán una disminución de su población superior al 50% entre 2017 y 2100.

2.2. Migración internacional

En algunas partes del mundo, la migración internacional se ha convertido en un componente importante del cambio demográfico. Entre 2010 y 2020, 36 países o áreas están experimentando un ingreso neto de más de 200 mil migrantes (26). En 14 de ellos,

se espera que la entrada neta total supere el millón de personas durante la década (26). Así, la contribución de la migración internacional a la población para los países de ingresos altos superó el saldo de nacimientos sobre defunciones y, según las previsiones, durante las próximas décadas la migración será el único motor del crecimiento poblacional en dichos países. Por el contrario, el aumento de la población en los países de ingresos bajos y medios-bajos seguirá estando impulsado por un exceso de nacimientos sobre las muertes.

Los grandes aumentos en el número de migrantes internacionales se explican principalmente por los movimientos de refugiados. De hecho, se estima que diez países están experimentando una salida neta de más de 1 millón de migrantes entre 2010 y 2022. Para muchos de estos, las pérdidas de población debido a la migración están motivadas por movimientos temporales de mano de obra, la inseguridad y el conflicto armado. En resumen, los cambios demográficos suponen un desafío mundial, tanto para los países donde los niveles de fecundidad siguen siendo altos (deben satisfacer las necesidades de un número cada vez mayor de niños y jóvenes), como para aquellos en donde se está produciendo un envejecimiento de la población (deben adaptarse a la creciente proporción de personas mayores y garantizar el acceso a la atención en salud, así como la educación en todas las edades y las oportunidades de empleo productivo) (31).

2.3. Fecundidad

Los niveles de fecundidad son el factor determinante más importante del tamaño y la estructura de la población en el futuro. La fecundidad media de 2,1 nacidos vivos por mujer a lo largo de la vida es aproximadamente el nivel necesario para que las poblaciones con baja mortalidad tengan una tasa de crecimiento de cero a largo plazo, también llamado “fecundidad a nivel de reemplazo” (32). Las tendencias de la población mundial están

impulsadas en gran medida por la disminución de la fecundidad. Ya en 1990, Europa, Australia/Nueva Zelanda y América del Norte registraban datos de fecundidad inferiores a 2 nacidos vivos por mujer. Según las estimaciones más recientes, a nivel mundial, la fecundidad es de 2,3 nacimientos por mujer en 2021 y se prevé que siga descendiendo aún más hasta los 2,1 nacimientos por mujer en 2050 (4).

Mientras que en 1990 más de un tercio de la población mundial vivía en países donde la fecundidad superaba los cuatro nacimientos por mujer, en 2019 solo el 12% de la población mundial vivía en contextos de fecundidad tan alta. De los 36 países o áreas con niveles de fecundidad superiores a 4 en 2019, 33 se encontraban en África subsahariana. Sin embargo, se espera que en 2050 solo Níger supere esos valores. Así pues, mientras que en 2019 cerca de la mitad de las personas en todo el mundo vivía en un país o área donde la fecundidad era inferior a 2,1 nacidos vivos por mujer, se espera que en 2050 el porcentaje de países ascienda al 70%. Por último, añadir que entre 1990 y 2019, el número de países o áreas con niveles de fecundidad muy bajos ($\leq 1,5$ nacimientos por mujer), aumentó de 8 a 25, mientras que, en 2019, el 6% de la población mundial vivía en contextos de fecundidad tan baja.

La fecundidad y su impacto en el crecimiento de la población están fuertemente ligados a la edad media de maternidad, la cual es muy desigual entre países. Esta es más baja en América Latina y el Caribe (27,3 años) y más alta en Australia y Nueva Zelanda (30,8 años), seguidos de Europa y América del Norte (29,8 años). Cabe destacar que la maternidad adolescente, que pueden tener consecuencias sociales y de salud adversas tanto para las madres jóvenes como para sus hijos, ha disminuido en la mayoría de los países, aunque sigue siendo elevada en África subsahariana, América Latina y el Caribe (15% de la fecundidad total en la región) (33).

Organizaciones como la OMS y la ONU, a través de “Estrategia mundial para la salud de la mujer, el niño y el adolescente (2016-2030)” (33) y la “Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible” (16), respectivamente, buscan garantizar la salud reproductiva a través del acceso universal a servicios de salud sexual y reproductiva, promover una educación de calidad para todos y empoderar a las mujeres y las niñas mediante la eliminación del matrimonio infantil, precoz y forzado, y la búsqueda de la igualdad de género. De esta manera, son varias las iniciativas internacionales que respaldan la maternidad tardía como parte de los esfuerzos para garantizar la salud reproductiva, la educación y el empoderamiento de las mujeres y las niñas.

2.4. Mortalidad y esperanza de vida

La esperanza de vida es el indicador más ampliamente utilizado para realizar comparaciones sobre la incidencia de la mortalidad en distintas poblaciones y, en base a ello, sobre las condiciones de salud y nivel de desarrollo de una población (34). Entre 1990 y 2019, todos los países y regiones han visto aumentada su esperanza de vida. El aumento más significativo ha tenido lugar en el África subsahariana, donde las mejoras en la supervivencia agregaron casi 12 años más de media de vida, alcanzando los 61,1 años en 2019. La esperanza de vida al nacer para la población mundial alcanzó los 72,6 años en 2019, un incremento de más de 8 años desde 1990. Entre los factores que han favorecido el aumento de la esperanza de vida al nacer en todo el mundo se encuentran: (i) los avances médicos y tecnológicos, (ii) la reducción en las tasas de mortalidad infantil, (iii) los cambios en los hábitos nutricionales y estilos de vida y (iv) la mejora en los niveles de condiciones materiales de vida y educación, así como el acceso de la población a los servicios sanitarios.

Se prevé que el incremento en la supervivencia continúe en todas las regiones y den como resultado una duración media de vida global de alrededor de 77,1 años en 2050. A pesar de todo, si bien se ha logrado recortar la diferencia de longevidad entre países, las brechas siguen siendo relativamente amplias. La esperanza de vida en los países pobres está 7,4 años por debajo del promedio mundial, debido a los altos niveles de mortalidad infantil y materna, a la violencia y los conflictos o al impacto persistente de la epidemia del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). En todos los países y regiones, las ganancias proyectadas en la esperanza de vida dependen del progreso continuo en la prevención y el tratamiento de enfermedades crónicas, enfermedades asociadas al envejecimiento, enfermedades infecciosas (incluido el VIH), así como de la ausencia de eventos catastróficos, como guerras o grandes epidemias de enfermedades mortales.

2.5. Consecuencias del envejecimiento de la población: edad de jubilación

Un aspecto clave en la evolución de las últimas décadas ha sido la reducción sostenida de la tasa de mortalidad de las personas mayores y, por tanto, la mejora de las expectativas de vida. Según las previsiones del informe de la ONU, una de cada seis personas en el mundo tendrá más de 65 años en el 2050, lo que equivale al 16% de la población mundial. Esta proporción está incrementada más aún en los países del primer mundo de Europa y América del Norte, siendo uno de cada cuatro individuos mayores de 65 años. De la misma forma, el número de personas mayores de 80 años se triplicará en 2050, pasando de 143 millones en 2019 a 426 en 2050.

La ONU concluye que los países con poblaciones que envejecen deben tomar medidas para adaptar los programas públicos a la creciente proporción de personas mayores, incluso mejorando la sostenibilidad de la seguridad social y los sistemas de pensiones y estableciendo sistemas universales de atención de la salud y cuidados a largo plazo (4).

De igual manera, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (en español, “OCDE”) (35) -organización internacional que recopila y analiza los datos de diferentes países y cuya misión principal es promover políticas para favorecer la prosperidad, la igualdad, las oportunidades y el bienestar para todas las personas- indica en su informe de 2019 “*Fiscal Challenges and Inclusive Growth in Ageing Societies*” (36) la necesidad creciente en las sociedades más envejecidas de impulsar políticas que promuevan el envejecimiento saludable y mejoren la empleabilidad de las personas mayores, que incluye, entre otras medidas, el incremento de la edad de jubilación.

En este contexto, la tendencia hacia una prolongación de la vida laboral en España y en todo el mundo ha estado motivada por una combinación de factores demográficos, económicos y políticos. El aumento de la esperanza de vida, unido a una proporción creciente de personas mayores, ha creado presiones sobre los fondos de pensiones, llevando al gobierno español a implementar medidas para retrasar la edad de jubilación. Así, en España, en el año 2013, la edad exigida de jubilación era de 65 años con un período cotizado de 35 años y 3 meses, o de 65 años y 1 mes con períodos menores de tiempo cotizado. Sin embargo, en 2023, la jubilación a los 65 años requiere un período cotizado mayor o igual a 37 años y 9 meses, ascendiendo a los 66 años y 4 meses en caso contrario. Esta política tiene como objetivo fijar un tope en la edad de jubilación en el año 2027 en 67 años para todos aquellos ciudadanos con una cotización menor de 38 años y medio (37).

Esta tendencia responde a la necesidad de mantener el sistema de pensiones en unas sociedades cada vez más envejecidas. Son muchos los países que ya se han visto obligados a realizar cambios en las políticas de jubilación para adaptarlas a la nueva realidad social. Bulgaria, Italia, Grecia, Islandia, Noruega y Estados Unidos, establecen en el año 2023 una edad para el acceso a la jubilación de 67 años. Otros países (incluido

España) se encuentran en proceso de aumentar la edad de jubilación de manera progresiva, como por ejemplo el Reino Unido (67 años en 2028 y 69 años en 2046), Alemania (67 en 2031) y Países Bajos (67 años en 2028). Dinamarca, que en 2023 tiene fijada la edad de jubilación en 65 años, incluye en su actual política aumentarla hasta los 69 en 2035 (36).

La dinámica cambiante de las edades de jubilación refleja una respuesta adaptativa a los desafíos demográficos y económicos a nivel global, llevando consigo una reevaluación continua de las políticas y prácticas relacionadas con la jubilación tanto en España como en todo el mundo, donde algunos países han incorporado ya -siguiendo las recomendaciones de la OCDE- un planteamiento de la edad de jubilación ajustada a la esperanza de vida en cada momento (38). Así, la relación entre la edad de jubilación y la calidad de vida en la vejez se ha convertido en un tema de gran relevancia, observándose que, en muchos casos, una prolongación de la vida laboral puede contribuir no sólo a la sostenibilidad de los sistemas de pensiones, sino también a la salud y el bienestar general de los individuos mayores. Por tanto, en la actualidad, es de especial relevancia la investigación sobre factores que promuevan alcanzar el objetivo prioritario en las sociedades actuales de un envejecimiento saludable.

3. ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO

El envejecimiento biológico implica una disminución general de las funciones biológicas y de la resistencia al estrés que conducen a un aumento de la mortalidad con la edad (39). Este deterioro general de las funciones biológicas es el principal factor de riesgo de las patologías humanas relacionadas con la edad, como el cáncer, la diabetes, los trastornos cardiovasculares (aterosclerosis y enfermedad cerebro-vascular) y las enfermedades neurodegenerativas (40). La investigación sobre el envejecimiento ha experimentado un avance sin precedentes en los últimos años, particularmente con el descubrimiento de que la tasa de envejecimiento está controlada, al menos en cierta medida, por vías genéticas y procesos bioquímicos conservados en la evolución tales como (i) inestabilidad genómica, (ii) acortamiento de los telómeros, (iii) alteraciones epigenéticas, (iv) pérdida de la proteostasis, (v) disfunción mitocondrial, (vi) senescencia celular, (vii) agotamiento de células madre, (viii) desregulación de la sensibilidad a los nutrientes y (ix) comunicación intercelular alterada (40). El origen del envejecimiento es compartido con el del cáncer, esto es, la acumulación de daño celular dependiente del tiempo (40). Así pues, el proceso de envejecimiento es multifactorial, siendo los antecedentes genéticos y el estrés ambiental dos factores críticos (41). Los avances en la comprensión de los mecanismos básicos del envejecimiento han puesto de manifiesto que la esperanza de vida -que es propia de cada especie y se define como la edad media que pueden alcanzar los individuos de una población concreta en una época determinada (42)- puede manipularse mediante intervenciones biomédicas a nivel genético, farmacológico o basado en el estilo de vida (43). La longevidad es, pues, la consecución de una edad avanzada mayor a la esperable para un individuo en un momento dado y está estrechamente relacionada con el proceso de envejecimiento (44).

De hecho, el ser humano es cada vez más longevo. La ONU estima que la esperanza de vida al nacer aumentará de manera global de 72,8 años en 2019 a 77,2 en 2050 (45). En España, teniendo como fuente el INE, la esperanza de vida al nacer en 2021 fue de 83,3 años (85,8 años para las mujeres y 80,2 años para los hombres), con una tendencia al alza en la última década en edades medias y altas. Concretamente, para las personas de 80 años, la esperanza de vida en 2008 era de 9,0 años y en 2019 fue de 10,2 años. Esta tendencia se ha visto interrumpida en el año 2020 a causa de la pandemia de SARS-CoV-2, en el que ha caído la esperanza de vida en todas las edades, pero de forma más acusada en las edades altas. De ahí se deduce el creciente interés en la investigación sobre el envejecimiento saludable y la longevidad, que no sólo promete aumentar la esperanza de vida humana, sino también sus consecuencias sobre la salud de los individuos al prevenir, mitigar o revertir la carga de enfermedades degenerativas asociadas a la edad, lo cual comporta importantes efectos sociales y económicos sobre las poblaciones (46).

3.1. Senescencia celular

Las funciones de cada célula individual van destinadas a tres opciones principalmente: sobrevivir, envejecer (senescencia) o suicidarse (apoptosis). El equilibrio entre estos procesos asegura que la renovación celular en un organismo permanezca esencialmente en equilibrio funcional u homeostasis (47). En su inicio, las investigaciones sobre la senescencia celular se han centrado en su papel en la supresión de tumores (48). En la actualidad, se reconoce su contribución en procesos biológicos complejos como el desarrollo, la reparación de tejidos, el envejecimiento y los trastornos relacionados con la edad (49). Los nuevos hallazgos científicos indican que la senescencia representa una serie de estados celulares progresivos y fenotípicamente diversos adquiridos después de la detención del crecimiento inicial (50). De esta manera, aunque las células senescentes

experimentan un arresto proliferativo estable que protege contra la transformación neoplásica, adquieren un fenotipo secretor que tiene efectos nocivos a largo plazo (51). Ese fenotipo asociado a la senescencia (SASP por sus siglas en inglés, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*), descrito por primera vez por Coppé en 2008, incluye moléculas como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos y metaloproteinasas de la matriz, que generan un estado proinflamatorio crónico de baja intensidad (52). Así pues, el concepto de senescencia celular se encuentra causalmente relacionado con el de envejecimiento del organismo.

La senescencia celular está implicada en la generación de fenotipos relacionados con la edad y se postula que la eliminación de las células senescentes puede prevenir o retrasar la disfunción orgánica/tisular y prolongar la duración de la salud y la vida útil (53). Las células senescentes se acumulan en los tejidos envejecidos y contribuyen a generar los fenotipos y patologías relacionadas con la edad debido al agotamiento de las células competentes para la proliferación y de las células madre adultas (53,54). Esta acumulación, a su vez, interrumpe la homeostasis tisular, reduce la capacidad regenerativa del tejido u órgano en cuestión y remodela el microambiente tisular imitando un estado de inflamación crónica de bajo grado que resulta en un deterioro estructural y funcional irreversible (51). En la actualidad se acepta que el factor determinante del papel beneficioso o perjudicial de la senescencia celular es la duración de las propias células senescentes en los órganos y tejidos. De esta manera, el tipo de senescencia celular a largo plazo es propenso a la inflamación y a la enfermedad, mientras que el tipo a corto plazo puede resultar beneficioso por la rápida eliminación de las células senescentes, lo cual se relaciona positivamente con el recambio y renovación tisular, los procesos de cicatrización y la supresión tumoral (55).

Estas líneas de investigación en la actualidad van dirigidas a identificar los mecanismos implicados en la generación y regulación de las células senescentes con objeto de retrasar su aparición e incluso eliminarlas en la medida de lo posible con el fin último de prolongar la vida útil de los órganos y tejidos y, por ende, de los individuos. Sin embargo, la evidencia reciente indica que tanto las terapias pro-senescentes como las terapias anti-senescentes pueden ser beneficiosas. Las terapias pro-senescentes contribuirían a minimizar el daño al limitar tanto la proliferación celular en el cáncer como la fibrosis que suele tener lugar durante la reparación tisular posterior, mientras que las terapias anti-senescentes podrían ayudar a eliminar las células senescentes acumuladas y recuperar la función tisular (56).

Descubrimientos recientes apuntan que la eliminación selectiva de las células senescentes mejora la salud en modelos animales en el contexto del envejecimiento normal y reduce las consecuencias de las enfermedades relacionadas con la edad (53,57,58), hallazgos que han impulsado la investigación sobre compuestos capaces de eliminar las células senescentes. Sin embargo, el principal escollo que presentan estas llamadas “terapias senolíticas” es la falta de biomarcadores universales de senescencia y la heterogeneidad de los fenotipos senescentes *in vivo* (59). A medida que avanzan las técnicas biológicas, se han identificado numerosos nuevos mecanismos y vías de señalización que participan en la regulación de la senescencia celular, convergiendo todos ellos en la inflamación desregulada, la alteración de las modificaciones epigenéticas y el desequilibrio metabólico (47). La investigación en curso sobre las vías que inician y mantienen la senescencia proporcionará información para identificar biomarcadores y terapias potenciales para atacar las células senescentes (55).

3.2. Biomarcadores de envejecimiento biológico

Un biomarcador de envejecimiento es un parámetro biológico de un organismo que, o bien solo o bien en combinación con otros factores y en ausencia de enfermedad, predice mejor la capacidad funcional a una edad tardía que la edad cronológica (60). Desde la década de 1980, se ha reconocido la necesidad de biomarcadores de envejecimiento válidos y confiables para lograr el antiguo objetivo de comprender, retrasar, detener o incluso revertir el proceso de envejecimiento (61). La Federación Estadounidense para la Investigación del Envejecimiento (AFAR) estableció una serie de criterios para definir los biomarcadores de envejecimiento. Concretamente, la AFAR considera un buen biomarcador de envejecimiento aquel que (i) predice la tasa de envejecimiento, (ii) monitorea un proceso básico que subyace al proceso de envejecimiento y no los efectos de la enfermedad, (iii) puede probarse o medirse repetidamente siguiendo el principio de *primum non nocere* (no hacer daño al individuo) y (iv) que debe servir tanto para humanos como para animales de experimentación con el fin de ser probados en ellos antes de validarse en humanos (62).

Los biomarcadores cuantitativos del envejecimiento son herramientas valiosas para medir la edad biológica, evaluar el grado de envejecimiento saludable y, potencialmente, predecir la duración de la salud y la vida de un individuo (63). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descubierto el marcador o combinación de marcadores perfectos debido a dos motivos fundamentalmente: (i) a la dificultad de separar el envejecimiento normal de las patologías relacionadas con éste y, (ii) a que la tasa de envejecimiento biológico también puede variar entre diferentes tejidos (64). El análisis de un único biomarcador para describir el complejo proceso del envejecimiento resulta casi utópico, puesto que muchos factores influyen en dichos marcadores. Por tanto, parece sensato emplear un conjunto de marcadores para determinar la edad biológica -asumiendo no que existe un

consenso- que permitan establecer un optimizado nivel de decisión clínica tanto en medicina preventiva como curativa (65).

Los marcadores biológicos de envejecimiento pueden clasificarse atendiendo a distintos criterios: (i) medidas antropométricos (e.g., peso, talla o índice de masa corporal), (ii) medidas fisiológicas (e.g., tensión arterial, frecuencia cardíaca, capacidad respiratoria o capacidad visual y auditiva), (iii) medidas psicológicas (e.g., capacidad cognitiva), (iv) determinaciones bioquímicas (e.g., hormonas, vitamina D, o lípidos), (v) respuesta inmunológica (e.g., inflamación crónica), (vi) estrés oxidativo y datos genéticos (e.g., acortamiento de los telómeros, epigenética) (63,65). A continuación, se tratarán algunos de estos marcadores, concretamente aquellos sobre los que existe mayor evidencia de su papel causal en el proceso de envejecimiento y la senescencia celular.

3.2.1. Acortamiento de los telómeros

La replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) es un paso fundamental para asegurar la duplicación precisa del material hereditario y la división en células idénticas que permite la propagación del material genético entre generaciones y asegura la herencia de los rasgos fenotípicos celulares y del organismo (66).

La síntesis de ADN se inicia en sitios concretos, denominados “orígenes de replicación”, y procede de manera bidireccional en un proceso de replicación semiconservativa, sirviendo cada hebra de ADN de molde para la síntesis de la hebra complementaria gracias a la acción de la enzima ADN polimerasa (67). La ADN polimerasa avanza uniendo los nucleótidos complementarios a la hebra molde siempre en el extremo 3' pero no pueden iniciar la síntesis *de novo* de una cadena, sino que debe valerse de un segmento corto preexistente de ácido ribonucleico (ARN) llamado “cebador” (68). Instantes antes de comenzar la replicación, la doble cadena de ADN se

abre por la horquilla de replicación, el cebador se une al extremo de la hebra principal (aquella orientada en sentido 3' a 5' hacia la horquilla) y sirve de punto de partida para la replicación del ADN en un proceso de iniciación en los puntos de origen y posterior elongación por una ADN polimerasa (69). Por el contrario, la hebra retardada (que recibe este nombre porque su síntesis es más lenta) avanza hacia la horquilla en sentido 5' a 3', lo que ocasiona que en lugar de uno se requieran varios cebadores, formándose lo que se conoce como “fragmentos de Okazaki” (llamados así por su descubridora, Tsuneko Okazaki que, junto con su marido, postularon en 1968 el funcionamiento de dichas estructuras) (70). Por lo tanto, mientras que la síntesis de nuevo ADN en la dirección 5' a 3' requiere solo un cebador y es continua, la síntesis de una nueva hebra de ADN de 3' a 5' requiere la hibridación de múltiples cebadores de ARN que se alargan en fragmentos cortos de Okazaki y luego se ligan para formar la nueva cadena de ADN hija (71). Una vez que concluye la replicación, la degradación de los cebadores da como resultado espacios internos que son rellenados con las secuencias nucleotídicas complementarias por la acción de otra polimerasa (68). Sin embargo, el espacio dejado por el cebador del extremo terminal 5' de la hebra retardada permanece sin rellenar, fenómeno conocido como “la teoría del error al final de la replicación”, que ocasiona que una longitud de ADN de al menos el tamaño del cebador (alrededor de 250 nucleótidos de media), se pierda con cada replicación celular debido a la incapacidad de la ADN polimerasa para iniciar la síntesis de la cadena retardada desde el final del ADN lineal del extremo 5' (72,73) (**Figura 1**).

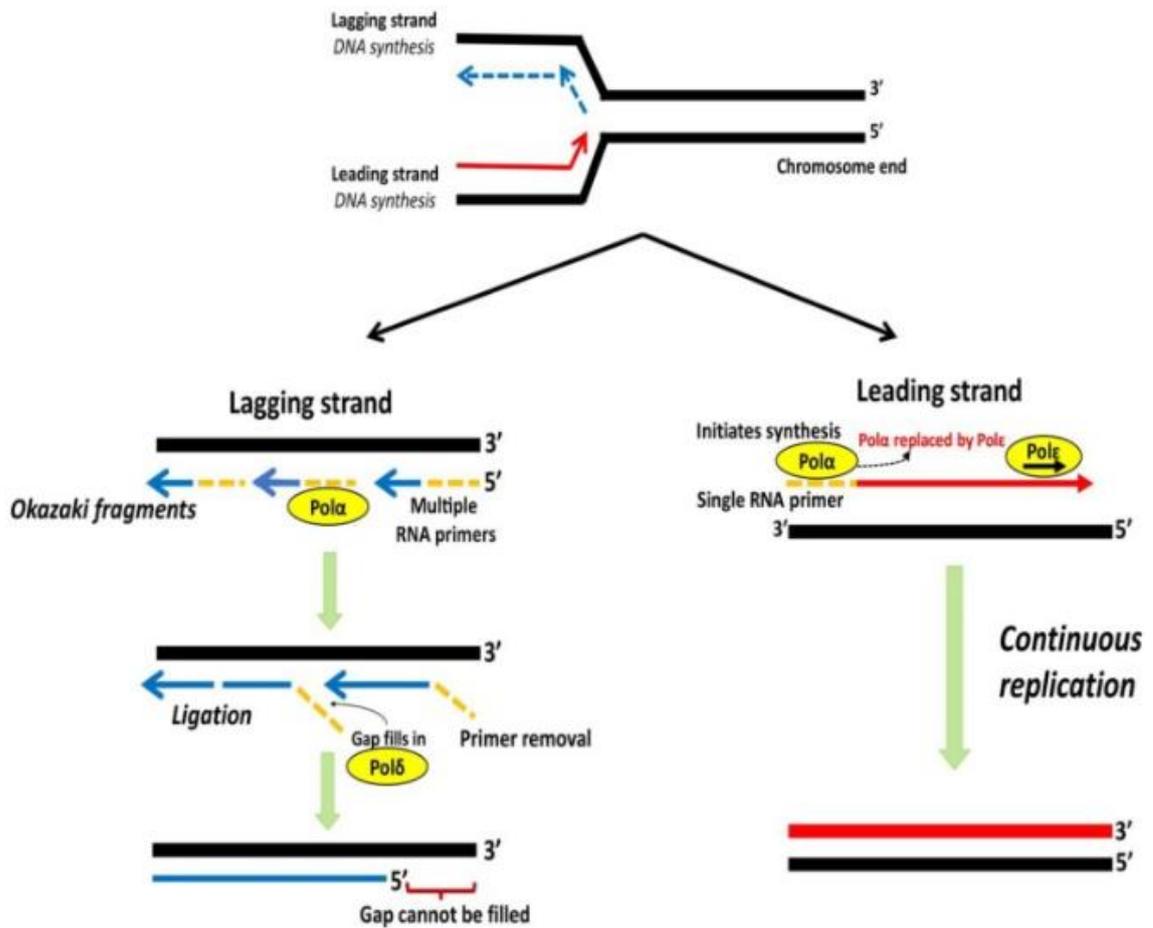


Figura 1. Representación esquemática de la replicación de las cadenas principal y retardada. La ADN polimerasa ($Pol\alpha$) con un único cebador de ARN inicia la síntesis de la cadena principal, que posteriormente es reemplazada por $Pol\epsilon$ para una mayor elongación. La cadena retrasada se copia a través de fragmentos discontinuos de Okazaki de múltiples cebadores. Los cebadores de ARN se degradan y los espacios se llenan con $Pol\delta$ seguido de la ligación de fragmentos discontinuos. El espacio en el extremo 5' permanece sin llenar, lo que da lugar a una región terminal no replicada. Figura extraída de (74).

Los telómeros, del griego “telos” (extremo) y “meros” (parte), son estructuras cromatínicas especializadas (ADN telomérico no codificante o ADNt) que se encuentran localizadas en los extremos de los cromosomas lineales de las células eucariotas para

protegerlos y evitar la fusión entre ellos, manteniendo así la integridad genómica (75). Fueron identificados por Hermann Müller durante la década de los años 30 como estructuras esenciales en los extremos de los cromosomas, pero no fue hasta 1978 cuando Elizabeth Blackburn identificó la primera secuencia telomérica y describió el papel de la enzima telomerasa, recibiendo el premio Nobel de Medicina y Fisiología por sus investigaciones 30 años más tarde (76). Los telómeros humanos miden entre 10 y 15 kb e incluyen una región proximal de doble hebra consistente en repeticiones en tándem de la secuencia TTAGGG/CCCTAA que se une a proteínas estructurales especiales conformando una región heterocromática muy estable que protege al ADNt, seguida de una región distal de una sola hebra rica en G que se pliega y evita la acción de la telomerasa (74). La telomerasa es una ribonucleoproteína con actividad enzimática. Concretamente, la porción ARN de la telomerasa proporciona la plantilla para la síntesis de las repeticiones en tándem de ADN (TERC, del inglés “Telomerase Reverse Catalitic subunit”) mientras que la subunidad catalítica (TERT, del inglés “Telomerase Reverse Transcriptase”) funciona como transcriptasa inversa transcribiendo la secuencia molde del ARN de la propia telomerasa a ADN en los extremos de los cromosomas (77). En humanos, ambas porciones de la telomerasa están codificadas por los genes a los que dan nombre: *TERC* (3q26.2) y *TERT* (5p15.33), respectivamente (78). El pico de actividad de la telomerasa ocurre en etapas tempranas del desarrollo embrionario, perdiéndose casi por completo en las células somáticas en la edad adulta y conservándose en células con gran actividad proliferativa como son (i) las células germinales, (ii) las células madre, (iii) células epiteliales pulmonares y del tracto gastrointestinal y (iv) las células cancerosas (79). La activación de la telomerasa en algunos tipos de células parece compensar el acortamiento de los telómeros dependiente de la proliferación, lo que retrasa, pero no anula, el reloj mitótico inherente (80).

La senescencia celular fue descrita inicialmente por Hayflick y Moorhead en la década de los sesenta, cuando observaron que los fibroblastos humanos pulmonares cesaban su proliferación después de un número limitado de divisiones (alrededor de 50) antes de entrar en un arresto proliferativo estable en cultivo (81). A este tipo de senescencia se le conoce como “senescencia replicativa” (SR) y actualmente se sabe que es una consecuencia del acortamiento de los telómeros por desgaste después de repetidas divisiones celulares, lo que refleja el envejecimiento a nivel celular *in vitro* (82). Posteriormente se demostró que la senescencia celular se aplica *in vivo* con el envejecimiento de los tejidos después de identificar células senescentes en tejidos envejecidos y en sitios de patologías relacionadas con la edad (56). Así, mediante el acortamiento inducido de los telómeros y la represión de la actividad de la telomerasa en las células somáticas de los adultos, los telómeros proporcionan los medios para regular la duración de la vida celular.

La SR es, pues, desencadenada por telómeros críticamente acortados y sirve como una barrera natural para la tumorigénesis (83). Mientras que las células senescentes experimentan una regulación positiva de los genes supresores de tumores y los inhibidores del ciclo celular, también desarrollan gradualmente un SASP, convirtiendo a las células senescentes en células proinflamatorias (84). A su vez, estas células pueden escapar de la detención de la SR y sufrir una proliferación continua a través de un mecanismo de “alargamiento alternativo de los telómeros” (ALT) o a la reactivación de la expresión de *TERT* para promover la transformación maligna (85). En concreto, se ha descrito que la activación de la telomerasa se da en el 85% de los tumores cancerosos, mientras que en el otro 15% de los casos están activos diferentes mecanismos de mantenimiento de la longitud de los telómeros basados en la recombinación (86). Sin embargo, se ha descrito que previo al estadio de senescencia celular, la célula experimenta

un aumento transitorio de la actividad de la telomerasa que podría actuar como medio de protección reduciendo el estrés producido por el acortamiento de los telómeros y evitando la transformación en células cancerosas (87).

Diferentes modelos animales se han utilizado para estudiar el efecto del acortamiento de los telómeros sobre el envejecimiento y, aunque ha quedado patente que el acortamiento de los telómeros causa la activación de una “respuesta al daño del ADNt” y conduce a la senescencia celular, al envejecimiento del organismo y a la aparición de patologías relacionadas con la edad, en todas las especies los telómeros cortos no necesariamente predicen una vida útil corta (por ejemplo, los telómeros humanos son más cortos que los de los rodeadores, pese a tener una vida útil más larga) (88). Así pues, se ha propuesto la tasa de acortamiento de los telómeros y el aumento de los telómeros cortos como predictor de la esperanza de vida (89). En la actualidad, la hipótesis más prevalente para explicar la SR no es que la disfunción de los telómeros *per se* conduce al envejecimiento y las enfermedades asociadas con la edad, sino que es la respuesta al daño del ADNt la que causa la senescencia celular, la cual, junto con el SASP, facilita la pérdida de funciones tisulares relacionada con la edad (90).

En resumen, las células somáticas carecen normalmente de vías de mantenimiento de la longitud de los telómeros, lo que supone una pérdida neta de 100 a 200 pb de ADNt en cada división celular (91). En función de la tasa de acortamiento de los telómeros y de la longitud inicial de los mismos, una célula somática sólo puede sufrir un número definido de duplicaciones antes de que los telómeros se acorten críticamente y pierdan sus propiedades protectoras (límite de Hayflick), enviando a la célula a una detención terminal de su ciclo (senescencia replicativa) y posteriormente a la apoptosis. Este mecanismo de senescencia limita la vida replicativa de las células individuales y de los organismos y, también, representa una vía supresora de tumores al evitar la

inmortalización tumoral (92). Pero la senescencia también implica en ocasiones cambios en la expresión de algunos genes que dotan a dichas células de mayor resistencia a la apoptosis (93). Este es el mecanismo por el cual las células senescentes pueden acumularse en los tejidos y contribuir al proceso de envejecimiento y sus patologías asociadas (76).

Aunque inicialmente los estudios sobre la telomerasa y su hiperactivación iban dirigidos a la prevención y terapia contra el cáncer (94), cada vez son más los estudios sobre compuestos capaces de prevenir el acortamiento de los telómeros, mejorando la capacidad de reparación del ADN y retrasando la senescencia, como terapia antienvjecimiento (95). Los telómeros se acortan durante la replicación del ADN debido a la incapacidad de las polimerasas para copiar completamente la hebra retardada, el procesamiento final del ADN y el daño aleatorio, a menudo causado por el estrés oxidativo (96). La heredabilidad de la longitud de los telómeros oscila entre el 36% y el 90% (97,98). Así pues, aunque la longitud de los telómeros esté fuertemente determinada genéticamente, se ve influenciada por otros factores relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inductores de la senescencia celular (99). Dichos inductores pueden ser factores endógenos, como la disfunción mitocondrial (100) y la inflamación (101), o factores exógenos, como el tabaquismo, la dieta rica en grasas, la inactividad física, la quimioterapia, la radiación y otros factores ambientales o de estilo de vida (102–106).

Numerosos estudios sugieren que el acortamiento de los telómeros es un buen biomarcador de envejecimiento *in vivo* y un buen predictor de la morbilidad relacionada con la edad (96,107). Está ampliamente demostrado que el acortamiento de los telómeros se asocia con enfermedades relacionadas con la edad, como la hipertensión (108), la enfermedad coronaria (109–111) y la demencia (112), así como con factores de riesgo

generales de enfermedades como la resistencia a la insulina y la obesidad (113), entre otros. Además, se sabe que el estrés oxidativo y la inflamación -dos agentes causales del envejecimiento- aceleran el acortamiento de los telómeros, lo que sugiere que la longitud de los telómeros puede ser un biomarcador importante del envejecimiento porque refleja la carga acumulada de estrés oxidativo e inflamación (96).

3.2.2. Epigenética

El concepto de “epigenética” fue introducido por primera vez por Waddington para explicar cómo pueden surgir diferentes fenotipos sin cambios en el genotipo (114). Se define como el estudio de las modificaciones en la expresión de los genes que no se deben a cambios en la secuencia nucleotídica del ADN e incluye procesos que se agrupan en 3 grandes grupos: la metilación del ADN, la modificación postraduccional de las histonas y los ARN no codificantes (115). El proceso de envejecimiento se asocia con mecanismos epigenéticos alterados (116), siendo algunas de estas modificaciones epigenéticas transmisibles y hereditarias (e.g., patrones de metilación que funcionan como alelos desde un punto de vista genético) (117). De hecho, una revisión reciente que profundiza sobre seis tipos de estimadores biológicos potenciales de la edad (i.e., relojes epigenéticos, longitud de los telómeros, factores transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos y biomarcadores compuestos) concluyó que el reloj epigenético es el estimador molecular más prometedor de la edad biológica (64).

Los genomas de las células senescentes experimentan cambios epigenéticos globales que conducen al silenciamiento de genes y a la activación de elementos transponibles (118). En las células senescentes se han descrito la aparición de focos de cromatina compactada enriquecidos en una variedad de marcadores heterocromáticos: histonas hipoacetiladas, trimetilación de histona H3 lisina 9 y 27, proteínas de la familia de la

proteína de la heterocromatina 1 y la variante de histona macroH2A. Estas marcas epigenéticas reprimen la transcripción de genes clave relacionados con la proliferación y reciben el nombre de “focos heterocromáticos asociados a la senescencia” (SAHF, por sus siglas en inglés) (51). Un tipo de cambio epigenético que se ha observado exclusivamente en células senescentes es la descondensación del ADN satélite pericéntrico, fenotipo denominado “distensión de satélites asociada a la senescencia” (SADS) (118). Esto ocasiona que la heterocromatina en las regiones centroméricas y pericentroméricas se vuelva más abierta y aumente la transcripción de secuencias satélite.

Las condiciones ambientales también pueden afectar al epigenoma celular para regular la expresión génica y controlar el destino celular (119). La acumulación de cambios epigenéticos asociados con el envejecimiento podría conducir a una regulación aberrante de la expresión génica, a la inestabilidad metabólica, a la senescencia celular, al agotamiento de las células madre y al desequilibrio en la homeostasis tisular, todo lo cual contribuye al envejecimiento del organismo (115).

a. Metilación del ADN

La metilación del ADN (ADNm) es un proceso dinámico de suma importancia para el desarrollo embrionario de los mamíferos cuya principal e importante función es el silenciamiento génico por represión de la transcripción y por la remodelación y modificación de la cromatina (120). Los cambios epigenéticos como la hipermetilación y la hipometilación del ADN influyen significativamente en la longevidad humana al activar/desactivar diferentes genes implicados en mecanismos fisiológicos que conducen al envejecimiento (121).

Los niveles de ADNm y, en particular, el patrón de 5-metilcitosina (el más común en células eucariotas) se alteran durante el envejecimiento y contribuyen a las enfermedades

relacionadas con la edad (116). Este estado de metilación del ADN se puede utilizar para predecir la edad biológica en los tejidos, por lo que se ha denominado “reloj epigenético” (122,123). La metilación del ADN puede ejercer también funciones protectoras de la estabilidad genómica a través de las repeticiones en tándem de satélites que se encuentran en las regiones teloméricas, centroméricas y pericentroméricas (124). También se ha demostrado que la hipermetilación de genes supresores de tumores previene la senescencia celular (125). Así pues, la evidencia reciente de estudios en humanos y ratones demuestra que los biomarcadores basados en la metilación del ADN satisfacen los criterios anteriormente expuestos de un biomarcador molecular de envejecimiento (62). El estudio del ADNm sirve para investigar cómo difiere la edad epigenética estimada entre un grupo de individuos de la misma edad cronológica y cómo esta edad epigenética puede ayudar a determinar el impacto de los factores de estrés endógeno y exógeno en el envejecimiento biológico (122). Quizás la característica más prometedora de los biomarcadores de ADNm es que los cambios epigenéticos son reversibles, lo que plantea la posibilidad de que las estimaciones de la edad epigenética mediante ADNm puedan ser útiles para identificar o validar intervenciones antienvjecimiento.

b. Modificación postraduccional de las histonas

La cromatina es una estructura altamente organizada que contiene ADN, proteínas histonas y otras proteínas cromosómicas (126). El nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina y está compuesto por un octámero de las cuatro histonas centrales (i.e., H3, H4, H2A y H2B) alrededor del cual se envuelven 147 pares de bases de ADN (127). Las colas N-terminales de las histonas están sujetas a modificaciones postraduccionales, que influyen en numerosos procesos biológicos como la transcripción, la replicación y el mantenimiento de los cromosomas (126). Las modificaciones postraduccionales se dan

en los residuos de lisina, arginina, treonina, tirosina y serina de los extremos N-terminales de las histonas y, al contrario que el ADN que sólo es modificado covalentemente mediante metilación o hidroximetilación, abarcan al menos ocho tipos diferentes de modificaciones: ubiquitinación, acetilación, fosforilación, metilación, ADP ribosilación, sumoilación, deiminación e isomerización de la prolina, cubriendo las tres primeras más de 90% de todas las modificaciones postraduccionales reportadas (127). La modificación epigenética de las histonas tiene implicaciones críticas para el envejecimiento y puede modular la esperanza de vida, ya que actúan como un vínculo entre los procesos de estrés oxidativo-inflamación-envejecimiento y, además, se han relacionado con enfermedades asociadas con la edad (neurodegenerativas, metabólicas, renales, cardiovasculares y óseas), así como con el cáncer (128). La FDA ha aprobado varios inhibidores de la fosforilación y la acetilación para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y ofrecen un potencial único para investigar tanto los efectos beneficiosos como los secundarios de emplear dichos fármacos en una amplia gama de estados patológicos asociados al envejecimiento, pero también en el envejecimiento general (128).

c. ARN no codificantes

El 75% del genoma humano se transcribe en ARN, mientras que sólo el 3% se transcribe en ARN mensajero (ARNm) que codifican proteínas (129). Esto quiere decir que la mayor parte del genoma humano se transcribe a ARN no codificante (ARNnc), el cual, además de sus funciones a nivel transcripcional y postranscripcional, (i) desempeña un papel importante en la regulación epigenética de la expresión génica, (ii) participa en la formación de orgánulos sin membrana y (iii) contribuye en la regulación de la estabilidad genómica y en la respuesta al estrés (130).

En función de su localización, secuencia y estructura secundaria pueden diferenciarse varios subtipos de ARNnc, siendo los más conocidos el ARN transferente y el ARN ribosómico (131). Sin embargo, en los últimos años se ha revelado que son el micro ARN (miARN) y el ARN largo no codificante (ARNlnc) quienes desempeñan un papel importante en el control del envejecimiento y la senescencia celular (132).

Los miARN son transcritos monocatenarios con un tamaño aproximado de 22 nucleótidos. En los últimos años se ha descubierto que los miARN (incluidos miR-106b, miR-125b, miR-126, miR-146a, miR-21, miR-22, miR-29, miR-210, miR-34a, miR-449a, miR-494, el grupo miR-17-92 y la familia miR-200) son actores importantes en el control del envejecimiento y la senescencia celular mediante la regulación de la expresión génica, ya sea por represión de la traducción o por degradación del ARNm (133). En el citoplasma, los miARN maduros se dirigen a ARNm específicos (principalmente en la región 3' no traducida) a través de una complementariedad parcial y reducen la estabilidad y/o la traducción del ARNm objetivo (134).

Los ARNlnc son transcritos cuyo tamaño varía desde alrededor de 200 pb hasta cientos de kb (132). Los ARNlnc tienen la particularidad de que se pueden transcribir en dirección sentido o antisentido con respecto al ARNm de referencia, así como a partir de regiones intrónicas y pueden surgir de mutaciones en el ARNm, de reordenamientos cromosómicos y de inserciones de transposones (135). Estos pueden (i) modular la transcripción influyendo en la organización de la cromatina y controlando la iniciación de la ARN polimerasa II mediante el reclutamiento de activadores o represores transcripcionales (136), (ii) pueden regular la expresión génica postranscripcionalmente modulando el empalme del pre-ARNm, la traducción de proteínas o la estabilidad de ambos (137), (iii) pueden actuar como “señuelos” para factores como los microARN y

modular así su impacto sobre los ARNm objetivo (138) y (iv) pueden actuar como andamios facilitando el ensamblaje de complejos multiproteicos (139).

Un número creciente de microARN y ARNlnc son reconocidos como moduladores robustos de los principales programas reguladores de la senescencia, la vía p53/p21, la vía pRB/p16, SASP y patrones de proteínas que controlan estas y otras facetas de la senescencia (**Figura 2**).

Las últimas investigaciones apuntan que los ARN circulares (ARNcirc), una subclase altamente estable de ARNlnc debido a la ausencia de extremos 5' y 3' y presente en eucariotas (132), contribuyen a la senescencia celular y la patogénesis de enfermedades asociadas al envejecimiento (140).

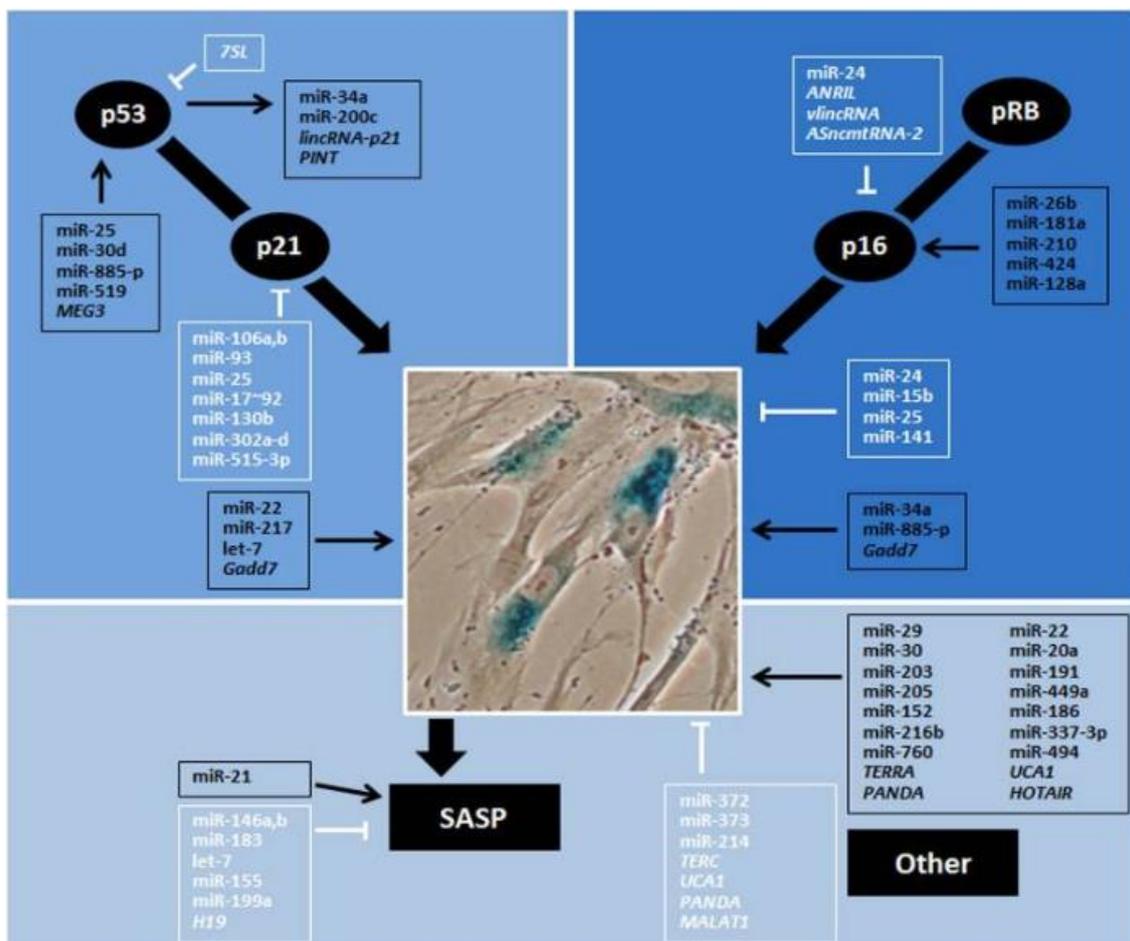


Figura 2. Representación esquemática de los principales microARN y ARNlnc que promueven (negro) o inhiben (blanco) los fenotipos de senescencia impulsados por p53/p21 (arriba a la izquierda), pRB/p16 (arriba a la derecha), SASP y otros mediadores (abajo). Centro: fibroblastos senescentes que muestran un color azul indicativo de la actividad SA-β-galactosidasa (SA-β-gal) (132).

3.2.3. Genes relacionados con la longevidad y el envejecimiento

La longevidad humana es en parte hereditaria, estimándose que la heredabilidad de la esperanza de vida humana es de en torno al 25% (141). Además, se cree que la variación en los genes que regulan el mantenimiento somático y las funciones de reparación del ADN modulan el proceso de envejecimiento y contribuyen a la supervivencia a una edad avanzada (142). La identificación de genes y vías relevantes para la longevidad humana ha sido posible gracias a la investigación sobre sistemas modelo (que presentan la ventaja de tener una corta vida útil, un bajo mantenimiento y posibilidades de manipulación [e.g., levaduras, gusanos, moscas de la fruta o mamíferos como ratones, monos o perros]) (46) y también gracias al avance en las técnicas de biología molecular y análisis comparado (e.g., secuenciación de nueva generación [NGS, del inglés *Next-Generation Sequencing*] o el estudio de asociación del genoma completo [GWAS, del inglés *Genome Wide Association Studies*]) (44).

El conocimiento de los genes y las vías que están desregulados en el envejecimiento, así como las enfermedades relacionadas con la edad, han aumentado dramáticamente en los últimos años. De hecho, pueden consultarse en diversas bases de datos (<http://genomics.senescence.info/genes>, GenAge, AnAge, LongevityMap, CellAge, DrugAge o Atlas del envejecimiento digital, entre otras) (143).

Los genes descritos asociados a patologías del envejecimiento y a la longevidad se pueden clasificar en distintos grupos que serán abordados a continuación (144).

A. *Genes relacionados con la resistencia al estrés*

TP53 es un gen que codifica la proteína reguladora del ciclo celular (p53) responsable de mantener la estabilidad del genoma, reducir la tasa de mutación y suprimir el cáncer (145). Sin embargo, existe una fuerte evidencia de que *TP53* tiene un papel complejo en la regulación de la longevidad. Tyner et al. (2002) demostraron que los ratones con p53 activado constitutivamente están casi libres de cáncer, pero su esperanza de vida se encuentra disminuida y, además, se acompaña de una atrofia tisular temprana (146). Un año más tarde, Dumont et al. (2003) comprobaron que el reemplazo de arginina (Arg) por prolina (Pro) en la posición 72 de la proteína p53 humana (rs1042522) disminuye su potencial apoptótico (147). Posteriormente, van Heemst et al. (2005) mostraron que los portadores del genotipo C/C (Pro/Pro) del codón 72 de *TP53* tienen un mayor riesgo de cáncer en comparación con los portadores de Arg/Arg pero, en contraste, tienen un aumento del 41% en la supervivencia a pesar de un aumento de 2,54 veces en la mortalidad por cáncer, sugiriendo que *TP53* humano protege contra el cáncer a costa de la longevidad (148).

Nebel et al. (2009), mapearon 92 polimorfismos de un único nucleótido (SNP) no sinónimos en 49 genes de reparación del ADN para una posible asociación con la longevidad en una muestra de casi 400 centenarios alemanes, encontrando que el alelo C (rs1776180) del gen *EXO1* se encuentra significativamente sobrerrepresentado en mujeres centenarias, sugiriendo que la variante rs1776180 se asocia con una esperanza de vida prolongada en mujeres (142). Por su parte, Soerensen et al. (2009) identificaron dos SNPs asociados con enfermedades relacionadas con la edad en los genes *MnSOD*

(superóxido dismutasa de manganeso) y *GPXI* (glutación peroxidasa 1), rs4880 y rs1050450 respectivamente, tras genotipar una cohorte de 1650 nonagenarios daneses, concluyendo que las variantes descritas aumentan la longevidad, disminuyen la discapacidad y aumentan la capacidad cognitiva (149).

Varios estudios europeos han encontrado una relación entre variantes de los 3 genes *HSP70*, que codifican la proteína de choque térmico 70, con la longevidad y el envejecimiento (150–152). Singh et al (2010) estudiaron las muestras de nonagenarios daneses y concluyeron que las variantes rs1008438 del gen *HSPA1A*, rs1061581 del gen *HSPA1B* y rs2227956 del gen *HSPAIL*, se asociaban a una peor supervivencia en términos de longevidad y a una percepción disminuida de la discapacidad propia del envejecimiento (150). Esto concuerda con los hallazgos de Altomare et al. (2003), en los que mujeres del sur de Italia experimentaron una disminución significativa relacionada con la edad de la frecuencia del alelo *HSPA1A* (rs1008438) (151). Ross et al. (2003) adicionalmente analizaron un polimorfismo del gen *HSPAIL* (T2437C) y observaron que el genotipo TT se asociaba a menor susceptibilidad a la enfermedad y mayor resistencia al estrés celular y al envejecimiento en una cohorte de población anciana irlandesa (152).

Montesanto et al. (2013) estudiaron diferentes polimorfismos de los genes *NOS1*, *NOS2* y *NOS3* (responsables de la síntesis de óxido nítrico [NO]) en más de 750 individuos del sur de Italia, demostrando que la variabilidad genética de los genes *NOS1* y *NOS2* tiene un efecto sobre los fenotipos comunes relacionados con la edad y la longevidad en humanos (153). En concreto, el alelo C-rs1879417 de *NOS1* se asoció con una menor probabilidad de supervivencia a una edad muy avanzada y menor rendimiento cognitivo, mientras que el alelo A-rs2297518 del gen *NOS2* se asoció a un menor rendimiento físico. Rose en 2011 y Dato en 2014, encontraron una asociación entre variantes del gen *UCPI* (proteína desacopladora 1) y *UPC2* (proteína desacopladora 2)

con la longevidad y el rendimiento físico, respectivamente (154,155). En humanos, las UCPs son un grupo de transportadores de membrana mitocondrial que funcionan como reguladores de la homeostasis energética y antioxidantes al desacoplar la respiración de la producción de ATP, permitiendo que la energía almacenada se libere en forma de calor, por lo que cabría esperar que dichas proteínas jugaran un papel importante en la tasa de envejecimiento y la vida útil (156).

B. Genes involucrados en la longitud de los telómeros.

Como se ha mencionado en el apartado 3.2.1, el acortamiento de los telómeros está asociado con enfermedades relacionadas con el envejecimiento y la mortalidad temprana. La longitud media de los telómeros en humanos muestra una considerable variación interindividual y una fuerte determinación genética (157). La longitud de los telómeros varía entre individuos y familias y sigue un patrón de herencia poligénico (158).

Lundblad y Szostak (1989) descubrieron que la disfunción del gen *EST1* en *Saccharomyces cerevisiae* da lugar a un fenotipo de telómeros cada vez más cortos que culmina en la senescencia celular (159). El gen *TERT* (homólogo en humanos) está localizado en el brazo corto del cromosoma 5 (5p15.33) y codifica para la subunidad de proteína con actividad transcriptasa inversa de la telomerasa. Más tarde, se identificó el gen *TERC* en el brazo largo del cromosoma 3 (3q26.2), el cual codifica para el componente de ARN de la telomerasa que sirve como plantilla para la síntesis de repeticiones teloméricas (77,78). Las mutaciones en *TERT* y *TERC* provocan una disfunción de la telomerasa que se asocia con numerosas enfermedades, incluida la fibrosis pulmonar idiopática (160), multitud de procesos neoplásicos (161) por inmortalización celular [e.g., melanoma (162), cáncer de tiroides (163), cáncer de mama (164,165), cáncer de pulmón (166,167), cáncer de vejiga (168), carcinoma adrenocortical

(169) o meningioma (170)], y los síndromes de envejecimiento prematuro (e.g., la disqueratosis congénita o la anemia aplásica) (171).

Por otro lado, Atzmon et al. (2010) estudiaron la herencia, el mantenimiento de la longitud de los telómeros y las variaciones en los genes *TERT* y *TERC* en una cohorte de judíos Ashkenazi centenarios y sus descendientes (158). Encontraron que los centenarios y sus descendientes mantienen telómeros más largos en comparación con los controles y que los telómeros más largos se asocian con la protección contra enfermedades relacionadas con la edad, una mejor función cognitiva y perfiles de lípidos asociados a un envejecimiento saludable. Además, encontraron que los genotipos CT y TT de la variante c.3097C>T del gen *TERT* estaba significativamente enriquecidos en los centenarios en comparación con los controles y que, de los 4 haplotipos más comunes derivados de las cuatro variantes más frecuentes, el haplotipo 1 estaba reducido significativamente en centenarios mientras que los haplotipos 3 y 6 estaban sobrerrepresentados, mostrando el haplotipo 3 una asociación positiva con la longitud de los telómeros. En esta línea, Scarabino et al. (2019) investigaron la influencia de la variación genética de *TERC* y *TERT* y la longitud de los telómeros en la esperanza de vida humana, encontrando que los genotipos L/L del gen *MNS16A* (un polimorfismo de número variable de repeticiones en tándem), y rs2853691 (A/G y G/G) de *TERT* se asocian con una edad significativamente menor al momento de la muerte (172). De igual manera, Concetti et al. (2013) describen una asociación negativa del alelo L/L de *MNS16A* con la longevidad humana y con la longitud de los telómeros (173).

Aunque los genes que codifican las diferentes subunidades de la telomerasa son los más estudiados, existen otros genes involucrados en el mantenimiento de los telómeros. Kim et al. (2012) encontraron que los genotipos A/A y A/G rs7896005 del gen *SIRT1* se asociaban positivamente con la longitud de los telómeros y con una mayor longevidad en

una cohorte de nonagenarios europeos, mientras que los diferentes genotipos de la variante rs132793 del gen *XRCC6* se asocian con la longitud de los telómeros, pero no con la longevidad (174). La asociación de las variantes de *SIRT1* con el envejecimiento ha sido demostrada en multitud de investigaciones en cohortes alrededor del mundo, así como su relación con enfermedades relacionadas con la edad como la diabetes, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson) (175–178). En un reciente estudio se comprobó que el agotamiento de *SIRT3*, mediado por la inactivación del gen *SIRT3* mediante CRISPR/Cas9, condujo a una integridad nuclear comprometida, pérdida de heterocromatina y senescencia acelerada en células mesenquimales humanas, y que la posterior reintroducción de *SIRT3* en (*SIRT3* -/-) aliviaba en parte la senescencia de dichas células. En conjunto, se postula que el gen *SIRT3* protege contra la senescencia y el envejecimiento, siendo una posible diana terapéutica para prevenir el deterioro de las células madre y mejorar las enfermedades relacionadas con el envejecimiento (179).

C. Genes implicados en el metabolismo y la división celular.

En este subgrupo, el gen *APOE* ha sido el más estudiado en cuanto a su relación con la longevidad y las enfermedades asociadas al envejecimiento. La *APOE* (apolipoproteína E) es una proteína multifuncional con diferentes efectos sobre la homeostasis lipídica y neuronal (180). El gen *APOE* se encuentra en el cromosoma 19q13.3 y los alelos *APOE2*, *APOE3* y *APOE4* codifican las tres isoformas proteicas principales (i.e., *APOE-ε2*, *APOE-ε3* y *APOE-ε4*) mediante la combinación de dos polimorfismos (rs7412 y rs429358) (39). En 1993, Eggertsen et al., encontraron diferencias significativas en términos de longevidad entre los genotipos de *APOE* de una muestra de más de 400 individuos suecos, observando que la frecuencia de *APOE4* disminuyó con la edad

creciente (181). Un año más tarde, Schächter et al. y Jian-Gang et al. confirmaron estos hallazgos en centenarios franceses (182) y chinos (183). En la actualidad, es bien sabido que las distintas variantes de *APOE* son un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer, demencia, diabetes y otras afecciones crónicas relacionadas con el envejecimiento, así como con la longevidad (184–188).

Existen otros genes implicados en el metabolismo y la división celular que guardan relación con el envejecimiento y sus enfermedades asociadas y la longevidad, tales como los SNPs rs10047589 del gen *TXNRD1* (tioredoxina reductasa 1) y rs207444 del gen *XDH* (155,189).

D. Genes pertenecientes a la vía del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) /hormona del crecimiento (GH) e insulina

La vía de señalización de insulina/IGF-1 es la primera vía que ha mostrado estar asociada a la longevidad en animales, siendo también la más destacada y, hasta ahora, la mejor estudiada (190,191). Esta vía implica una cascada de eventos de fosforilación (fosfatidilinositol 3-quinasa [PI3K]/Akt/piruvato deshidrogenasa quinasa [PDK]) que finalmente regula la translocación nuclear y la actividad de la proteína FOXO (un factor de transcripción *Forkhead*) (192). Herndon et al. (2002) descubrieron que las mutaciones que disminuyen la actividad de la cascada de insulina/IGF-1 prolongan la vida útil (193). Pawlikowska et al. (2009) identificaron que un SNP intrónico (rs3803304) en el gen *AKT1* estaba significativamente asociado con una mayor esperanza de vida en una cohorte de ancianos caucásicos y afroamericanos de Estados Unidos, así como en centenarios judíos asquenazíes (194). Por otro lado, dos SNPs intrónicos (i.e., rs1935949 y rs4946935) del gen *FOXO3A* se asociaron con una mayor longevidad, pero sólo en mujeres (5). Lunetta et al. (2007) encontraron un SNP (rs6910534) cerca de *FOXO3A* que

se asoció robustamente con la longevidad humana y dos SNPs intrónicos (rs10507486 y rs4943794) del gen *FOXO1A* que mostraron relación con la edad al momento de la muerte (195). Li et al. (2009) describieron otros dos SNPs (rs2755209 y rs2755213) en el gen *FOXO1A* que mostraron una frecuencia reducida en el grupo de mujeres centenarias y tres SNPs (rs2253310, rs2802292 y rs4946936) del gen *FOXO3A3* con robustas asociaciones con longevidad en centenarios de ambos sexos (196). Willcox et al. (2008) estudiaron hombres estadounidenses longevos de ascendencia japonesa (edad mínima 95 años) y encontraron que tenían una o más copias del alelo “G” de rs2802292 del gen *FOXO3A3*, y que esto se relacionaba con un envejecimiento saludable (menor prevalencia de cáncer y enfermedades cardiovasculares, una mejor salud autoinformada y una función física y cognitiva alta) (197). Flachsbart et al. (2009) describieron que el polimorfismo rs3800231 del gen *FOXO3A* tuvo una asociación significativa con la longevidad humana al estudiar una cohorte de centenarios/nonagenarios alemanes no emparentados (198). Van Heemst et al. (2005), realizaron un estudio con octogenarios holandeses descubriendo que las mujeres portadoras del alelo del intrón 4A del gen *GHI* tuvieron (i) una altura y una mortalidad reducidas, así como (ii) que las repeticiones CA (alelo menor de 191 pb) del gen *IGF1* parecían contribuir con mayor longevidad femenina (199). Bonafè et al. (2003) encontraron que los sujetos que portaban al menos un alelo A del codón 1013 del gen *IGF-1R* (receptor del IGF-1) tenían niveles plasmáticos de IGF-1 libre más bajos y estaban más representados entre las personas de larga vida vs. jóvenes en una cohorte italiana (200). Por último, Kojima et al. (2004) describieron un haplotipo del gen *INSR* (receptor de señalización de la insulina) que estaba compuesto por dos SNPs intrónicos (rs3745548 y rs2252637) en desequilibrio de ligamiento y que era más frecuente en semisupercentenarios que en controles más jóvenes (201).

3.2.4. Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

La teoría de los radicales libres del envejecimiento establece que las ROS juegan un papel clave en la acumulación de daño celular relacionado con la edad y, en consecuencia, influyen en el envejecimiento y la longevidad (149). Estudios llevados a cabo en modelos animales han demostrado que la inducción de HSP, particularmente HSP70, disminuye en respuesta al choque térmico con el envejecimiento, lo que hace que el organismo sea más vulnerable al daño por estrés (202). Es bien conocido que las mitocondrias son impulsores potenciales de los fenotipos de envejecimiento, ya que la disfunción mitocondrial genera una respuesta de estrés compleja por la cual las células proliferativas pierden permanentemente la capacidad de dividirse, es decir, se vuelven irreversiblemente senescentes (203). Por otro lado, el NO se produce durante la oxidación de L-arginina a L-citrulina por una familia de enzimas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) llamadas óxido nítrico sintasas (NOS), con tres isoformas en mamíferos codificadas por tres genes NOS distintos denominados: neuronales (nNOS o NOS1), inducibles (iNOS o NOS2) y endotelial (eNOS o NOS3) (153). En conjunto, la disminución de la capacidad funcional y la resistencia al estrés de factores internos y externos están estrictamente relacionados y juntos pueden usarse como medidas de la tasa de envejecimiento (155).

3.2.5. Biomarcadores bioquímicos

La idea de que los cambios biológicos relacionados con la edad pudieran medirse fue propuesta por primera vez por Alex Comfort en 1969 (204). A lo largo de los años, se ha trabajado mucho en la identificación de biomarcadores del envejecimiento que puedan usarse para estudiar la senescencia en humanos. Sin embargo, debido a su complejidad, no se ha identificado ningún biomarcador que mida con precisión la tasa de

envejecimiento biológico por sí mismo (205). Por ello, las estimaciones de la edad biológica facilitan la fusión de múltiples biomarcadores en uno único multifacético que pueda resultar útil tanto en la investigación biológica como en la investigación de salud pública o la práctica clínica (206). Además, la edad biológica debe poder estimarse con biomarcadores que satisfagan los criterios establecidos para los biomarcadores del envejecimiento propuestos por la AFAR (ver apartado 3.2.) (207). En esta línea, Levine (2013) comparó medidas de edad biológica estimadas utilizando varios métodos propuestos en la literatura con el objetivo de determinar su validez y utilidad para predecir resultados de mortalidad (206). De los 21 biomarcadores considerados en su análisis, se seleccionaron 10 que correlacionaban significativamente con la edad cronológica, siendo 8 de ellos biomarcadores bioquímicos fácilmente obtenidos en sangre (i.e., proteína C reactiva (PCR), creatinina sérica, hemoglobina glicosilada, albúmina sérica, colesterol total, densidad óptica del citomegalovirus, fosfatasa alcalina sérica y nitrógeno ureico sérico) y 2 biomarcadores clínicos (i.e., volumen espiratorio forzado y presión arterial sistólica). Años más tarde, Levine et al. (2018) demostraron que la aceleración de DNAm (PhenoAge) se correlaciona positivamente con los niveles de proteína C reactiva, insulina, glucosa, triglicéridos y el índice cintura-cadera, mientras que se correlaciona negativamente con el colesterol HDL (208).

La inflamación crónica es una condición subyacente importante de muchas patologías relacionadas con el envejecimiento (e.g., aterosclerosis, artritis, cáncer, diabetes, osteoporosis, demencia, enfermedades vasculares, obesidad o síndrome metabólico) (209,210). En este contexto, niveles superiores del biomarcador inflamatorio PCR se asocian con un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad (211), así como con demencia, sarcopenia y osteoporosis (212). Además, niveles elevados de interleucina-6 (IL-6) se asocian inversamente a función física y cognitiva, pero positivamente a fragilidad y riesgo

de muerte en adultos mayores (213,214). Un estudio de cohorte japonés encontró que niveles reducidos de inflamación (definida por el título de citomegalovirus, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa y PCR) servían como predictor robusto de supervivencia excepcional (215).

Murata et al. (2023) compararon perfiles de biomarcadores bioquímicos (i.e., metabolismo, inflamación, hígado, riñón, anemia y estado nutricional) medidos a edades similares entre individuos excepcionalmente longevos y sus pares de vida más corta, encontrando que niveles más altos de colesterol total y hierro y niveles más bajos de glucosa, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferasa, gamma-glutamyl transferasa, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa y capacidad total de unión de hierro se asociaron robustamente con la probabilidad de alcanzar los 100 años de edad (216).

Las hormonas regulan y coordinan múltiples funciones fisiológicas. Sin embargo, se desconoce hasta qué punto los cambios en la regulación hormonal asociados a la edad y el aumento de la prevalencia de enfermedades endocrinas específicas contribuyen a la disminución de la función física y cognitiva propia del envejecimiento (217). A continuación, se discutirán algunas asociaciones entre hormonas circulantes y el envejecimiento.

A. Eje GH/IGF-1

El proceso de envejecimiento se caracteriza por una disminución de la amplitud y el nivel entre pulsos de secreción de GH, así como de IGF-1 (218). La disminución de la producción del eje GH/IGF-1 se correlaciona con un mayor porcentaje de grasa corporal total y visceral, una disminución de la masa muscular, una disminución de la aptitud física, un decremento de la función inmune y una reducción fisiológica de las concentraciones de estrógenos y andrógenos (217). Se ha demostrado en modelos

experimentales de animales vertebrados e invertebrados que la restricción calórica y las alteraciones genéticas que reducen la función en las vías de GH/IGF-1/insulina prolongan la esperanza de vida, aunque esto no está del todo claro en humanos (217).

B. Eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HHS)

El comportamiento del eje HHS está sometido a cambios con la edad, incluido un aplanamiento del ritmo diurno y un pico matutino más temprano (219). Esto da como resultado tasas más altas de producción de cortisol en 24 horas y niveles de cortisol libre, pero no hay diferencias en los niveles de globulina transportadora de cortisol a medida que aumenta la edad (220). Además, el eje HHS parece responder mejor al estrés debido, al menos en parte, a la reducción de la inhibición por retroalimentación negativa del cortisol (221). La enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β HSD1) cataliza la cortisona (biológicamente inactiva) a cortisol (metabolito activo) y su expresión aumenta en la piel con la edad (222). La expresión de 11 β HSD1 en el músculo se correlaciona inversamente con la fuerza muscular en personas mayores, lo que sugiere que, durante el proceso de envejecimiento, podría ocurrir una mayor acción catabólica del cortisol a través de este mecanismo en diversos tejidos (223). Varios estudios han proporcionado evidencia de que incluso un exceso leve de cortisol no es benigno y que este se asocia con hipertensión, intolerancia a la glucosa, eventos cardiovasculares y fracturas vertebrales (224,225). La dehidroepiandrosterona (DHEA) es el principal esteroide producido por la zona reticular suprarrenal y, en menor grado, por los ovarios y los testículos. A diferencia del cortisol y la aldosterona, su secreción disminuye con el envejecimiento. De hecho, alcanza su punto máximo alrededor de los 25 años y luego disminuye gradualmente con la edad, cayendo a concentraciones infantiles a los 80 años en la mayoría de los adultos (226). En los últimos años, numerosos investigadores han

informado hallazgos preclínicos de que la DHEA tiene eficacia preventiva y terapéutica en el tratamiento de las principales enfermedades asociadas con la edad, incluido el cáncer, el deterioro cognitivo, la osteopenia, la aterosclerosis, la diabetes, la obesidad y la sarcopenia, además de mejorar los efectos nocivos de la exposición excesiva al cortisol (227,228). Estudios epidemiológicos también han encontrado que niveles bajos de DHEA predicen un aumento de la mortalidad por todas las causas. Sin embargo, los ensayos clínicos en los que se administraron dosis orales de DHEA de 50 mg a 100 mg a personas de edad avanzada durante un máximo de dos años no han producido pruebas claras de beneficio en parámetros como la composición corporal, el volumen máximo de consumo de oxígeno y la capacidad muscular, la fuerza o la sensibilidad a la insulina (227).

C. Hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas desempeñan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de procesos metabólicos normales durante toda la vida (229). Las concentraciones de hormona estimulante de la tiroides (TSH) son más altas en los extremos de la vida y muestran una tendencia longitudinal en forma de “U” en poblaciones caucásicas con suficiente yodo, mientras que los niveles de triyodotironina libre (FT3) disminuyen con la edad (230). Barbesino (2019) postuló que la bioactividad de la TSH puede reducirse con el envejecimiento o que la tiroides puede ser menos sensible a la TSH (231). La mayoría de las personas mayores con concentraciones elevadas de TSH tienen concentraciones normales de tiroxina libre (FT4), condición conocida como hipotiroidismo subclínico. En estos casos, cuando la concentración de TSH es menor de 7 mUI/L no se ha asociado con un aumento en el riesgo de enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca, demencia, discapacidad o mortalidad (232–234). Por el contrario, cuando se han registrado niveles de TSH de 7 a

9,9 mUI/L y mayor de 10 mUI/L se han relacionado con mayor riesgo de mortalidad cardiovascular y accidente cerebrovascular y de enfermedad coronaria, mortalidad cardiovascular e insuficiencia cardíaca, respectivamente (233–235). Por su parte, el hipertiroidismo subclínico (concentraciones bajas de TSH con concentraciones normales de FT4) se asocia con un mayor riesgo de fibrilación auricular, osteoporosis, fractura de cadera, insuficiencia cardíaca y demencia en pacientes de edad avanzada sin tratamiento (236–238).

D. Vitamina D

La forma activa de la vitamina D es una hormona esteroide que modula una amplia gama de funciones moleculares y celulares, incluidas funciones inmunes, inflamación, senescencia celular y biología de los telómeros (239,240). La vitamina D está disponible en forma de ergocalciferol (vitamina D₂), que se origina a partir de fuentes vegetales, y colecalciferol (vitamina D₃), la forma animal y principal fuente (>90%). Además, la vitamina D₃ se sintetiza en la epidermis a partir del 7-hidrocolesterol tras una exposición corta a la radiación solar UV-B (290-315 nm). Tanto la vitamina D₃ como la vitamina D₂ se hidroxilan en el hígado por acción de la 25-hidroxilasa, lo que conduce a la forma circulante más abundante y biológicamente inactiva: la 25-hidroxivitamina D o calcifediol (25[OH]D). La 1 α -hidroxilación llevada a cabo por la enzima renal CY27B1 convierte a la 1,25-dihidroxivitamina D (1,25 (OH)₂ D₃) o calcitriol en la forma activa. Este paso está estrechamente regulado por la hormona paratiroidea y, bajo retroalimentación negativa, por el calcio, el fosfato, el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), el propio 1,25(OH)₂D₃ y, en menor medida, la calcitonina, la GH/IGF-1 y la leptina. Los efectos biológicos del calcitriol están mediados de manera genómica a través de su receptor nuclear VDR y no genómica a través de vías de

señalización intracelular por receptores de membrana plasmática (240,241). Los órganos diana clásicos del calcitriol son el esqueleto, el intestino y las glándulas paratiroides (242).

El envejecimiento afecta al metabolismo de la vitamina D a nivel de varios sistemas de órganos clave (243–245). La gran capacidad de la piel para producir calcitriol disminuye con el envejecimiento, aproximadamente un 13% cada década (246). La disminución de la absorción de calcio relacionada con la edad es multifactorial, incluyendo una reducción en los niveles séricos de 25(OH)D, la alteración de la 1 α -hidroxilación por la disminución de la función renal, la resistencia intestinal al efecto de la vitamina D, la resistencia renal al efecto estimulante de la hormona paratiroidea, la supresión del FGF23 y a la reducción posmenopáusicas en los niveles de estrógeno (243,244).

La deficiencia de vitamina D provoca malabsorción de calcio, hiperparatiroidismo secundario, aumento de la resorción ósea, pérdida ósea y fracturas (247). Además, el Estudio del Corazón de la Ciudad de Copenhague reveló un aumento gradual en el riesgo de cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico y muerte prematura en individuos con una edad media de 57 años con niveles reducidos de 25(OH)D (81,82). McCullough et al. (2019) encontraron una asociación entre bajos niveles de 25(OH)D y mayor riesgo de cáncer colorrectal (248), mientras que Zhang et al. (2015) reportaron una relación, aunque en menor medida, con el cáncer de vejiga (249). Otros estudios han demostrado que no hay asociación entre bajos niveles de vitamina D y riesgo de padecer cáncer de mama, pulmón y otros cánceres (250–253). Un metaanálisis realizado en 2017 por Gaksch et al. (edad media de los participantes 61,6 años y 10 años de seguimiento de media) encontró una asociación entre niveles bajos de 25(OH)D y un mayor riesgo de mortalidad por todas las causas excepto cáncer (254). Sin embargo, la mayoría de los metaanálisis de estudios observacionales han encontrado que

los niveles séricos bajos de vitamina D se asocian con una mayor mortalidad general por cáncer (254–258) y se especula que el efecto positivo de la suplementación con vitamina D sobre la mortalidad por cáncer podría ser más evidente en personas con niveles bajos de vitamina D (259). Por último, Goodwill et al. (2017) realizaron un metaanálisis de 26 estudios observacionales que reveló que los niveles bajos de vitamina D se asociaban con un peor rendimiento cognitivo y un mayor deterioro cognitivo (260).

E. Insulina

La diabetes en los adultos mayores es un problema de salud pública cada vez mayor (261). Concretamente, en España, la prevalencia de diabetes tipo 2 en mayores de 65 años se estima en torno al 30%, siendo más de la mitad de la población con DM2 mayor de 65 años de edad (262). Los cambios en la composición corporal que ocurren durante el envejecimiento, incluido el aumento de la adiposidad central y la disminución progresiva de la masa del músculo esquelético, aumentan la resistencia a la insulina, la disfunción mitocondrial, las vías inflamatorias y los cambios hormonales (263). La resistencia a la insulina se caracteriza por la disminución de la eficacia de la insulina en la utilización de la glucosa o la secreción excesiva de insulina para mantener la estabilidad de los niveles de glucosa en sangre (264). Tucker (2022) evaluó la asociación entre la resistencia a la insulina (calculada a partir de los niveles de glucosa e insulina en sangre en ayunas) y el envejecimiento biológico utilizando la longitud de los telómeros de los leucocitos, encontrando que la resistencia a la insulina explica las diferencias en el envejecimiento biológico debido fundamentalmente al IMC y la circunferencia de la cintura (especialmente esta última), pero no por sí sola (265). Yang et al. (2023) encontraron que los niveles elevados de HOMA-IR implican un aumento de la edad biológica y un mayor riesgo de envejecimiento avanzado (266). Los adultos mayores con diabetes son una

población vulnerable con mayor riesgo de sufrir síndromes geriátricos como depresión, disfunción cognitiva, dolor crónico, limitaciones funcionales y de movilidad, discapacidad, fragilidad, incontinencia urinaria y polifarmacia (267).

F. Otros

La melatonina (N1-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina endógena derivada de la serotonina que se sintetiza no sólo en la glándula pineal sino también en otros tipos de células (268). Sin embargo, el aumento nocturno de los niveles sanguíneos de melatonina es casi exclusivamente resultado de su síntesis y secreción circadiana por la glándula pineal (269). La melatonina (i) regula la respuesta inmune y la inflamación, (ii) modula los ritmos circadianos de sueño/vigilia y el *jet-lag*, (iii) actúa como un potente antioxidante restableciendo la permeabilidad de la membrana mitocondrial y estimulando enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y catalasa, (iv) promueve la resistencia contra el daño oxidativo al reparar las membranas microsomales y (v) actúa como agente anticancerígeno (270–272). Ko et al. (2019) informaron que la melatonina regula positivamente la expresión de Klotho, una importante proteína antienvjecimiento con poderosas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas (273). El descenso de los niveles de melatonina asociados a la edad se asocia a inflamación, estrés oxidativo, capacidad mitocondrial reducida y apoptosis celular, siendo todos ellos procesos fisiopatológicos comúnmente observados en el envejecimiento y sus enfermedades asociadas (274).

3.3. Disfunción del sistema inmunológico: inmunosenescencia

En 1962, Roy Walford propuso que las mutaciones que se acumulaban con la edad daban lugar a respuestas inmunitarias contra autoantígenos emergentes, provocando autoinmunidad (275). Pero no fue hasta 1978 cuando Singhal et al. (276) acuñaron el

término “inmunosenescencia”, concepto que perdura a día de hoy como la disminución de las funciones del sistema inmunológico debido al envejecimiento que afecta la composición, cantidad y función de los órganos inmunitarios, las células inmunitarias y las citocinas (277).

El envejecimiento produce cambios en los fenotipos y la función de las células inmunitarias, como el cambio de la diferenciación linfoide a la mieloide para las poblaciones de células B y T (143). De manera similar, los monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos pasan por modificaciones funcionales significativas, como una actividad fagocítica reducida y cambios en los receptores de reconocimiento de patrones, los cuales son cruciales para la detección de señales patógenas (143). Además, las células inmunes cambian la expresión de sus marcadores de superficie, haciéndose menos eficientes en la producción de ROS, mostrando una capacidad de migración comprometida y favoreciendo la producción de citocinas proinflamatorias sobre las antiinflamatorias. En general, este fenotipo de inmunosenescencia contribuye a la acumulación de daño celular y molecular en los tejidos envejecidos, potencia muchos trastornos relacionados con la edad como la aterosclerosis, la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas y, lo más importante, disminuye la respuesta eficaz a las infecciones, el cáncer y otras enfermedades (143).

Los principales mecanismos moleculares y celulares relacionados con la inmunosenescencia son el SASP, el acortamiento de los telómeros, las alteraciones metabólicas propias del envejecimiento y la inflamación crónica (277). La secreción persistente de SASP puede causar inflamación sistémica crónica, daño tisular e inhibición de la función de las células inmunitarias en los ancianos (278). La longitud promedio de los telómeros y la actividad de la telomerasa en los linfocitos y las células de memoria disminuyen con la edad, hecho que provoca daños en el ADN y la detención del ciclo

celular. Esto, en última instancia, altera la función celular y produce una eliminación ineficiente de los patógenos (279,280). La disminución de la actividad de la telomerasa suele ir acompañada de un aumento de ROS intracelular y una expresión reducida de CD28. Estas CD28-T senescentes producen una disminución de las citocinas antivirales y un aumento de las citocinas proinflamatorias (281). Los trastornos metabólicos de los principales nutrientes (como la glucosa, los lípidos y los aminoácidos) en las células inmunes durante el envejecimiento conducen a la desregulación del metabolismo de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) (282). La NAD⁺ disminuye con la edad, lo que es el resultado de una biosíntesis reducida de NAD⁺ causada por un estatus de inflamación crónica con aumento del estrés oxidativo y citoquinas inflamatorias, y un mayor consumo de NAD⁺ causado por daño al ADN (283).

Como ya se ha mencionado anteriormente, durante el envejecimiento se produce un estado de inflamación crónica de bajo grado. En este estado, muchos componentes (e.g., ácidos nucleicos, ADN mitocondrial, cardiolipinas, mitocondrias o proteínas de choque térmico) procedentes de la muerte o el daño celular pueden ser reconocidos por receptores inmunes innatos (e.g., receptores tipo toll [TLR], receptores tipo NOD [NLR] o la cGMP-AMP sintasa [cGAS]), produciendo citocinas proinflamatorias (284). Los cambios en la microbiota intestinal de los ancianos pueden activar los macrófagos a un estado proinflamatorio y que éstos a su vez activen a otras células inmunes al secretar factores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) y el interferón gamma (IFN- γ) (285). De forma natural, los mediadores inflamatorios promueven la mielopoyesis y aumentan las células inmunosupresoras (especialmente las células T reguladoras y los macrófagos M2) que secretan factores inmunosupresores (e.g., factor de crecimiento transformante beta [TGF- β], ROS y la interleucina-10 [IL-10]). La IL-10 apoya aún más la proliferación y activación de células T reguladoras y macrófagos M2

(286). Estos factores también inhiben algunas células inmunes y promueven su inmunosenescencia. Específicamente, el TGF- β puede inhibir la diferenciación de las células T colaboradoras (CD4+), reducir la citotoxicidad de las células T CD8 y las células natural-killer (NK) y debilitar la respuesta inmune de las células B (287). Sin embargo, en el envejecimiento se produce un desequilibrio entre las reacciones inflamatorias e inmunes debido al aumento persistente de la respuesta inflamatoria, hecho que provoca la activación de los linfocitos T/B (parálisis inmune) y se considera una de las características clínicas de la inmunosenescencia (288). Además, los altos niveles de citocinas proinflamatorias dañan las células B humanas y reducen significativamente la producción de anticuerpos protectores (289).

Con el envejecimiento también se produce un deterioro de los órganos y tejidos del sistema inmunitario. La médula ósea contiene células madre hematopoyéticas que poseen capacidad de autorrenovación y dan lugar a todas las células sanguíneas del sistema inmunológico (290). Las células madre hematopoyéticas disminuyen con el envejecimiento y registrar un mayor daño en el ADN con la edad, lo que condiciona una disfunción y un sesgo mielóide que afecta gravemente a la generación de células T vírgenes (291). Estudios previos han demostrado que el TGF- β podría inhibir las HSC con tendencia linfóide (292) y que cambios en los diferentes microARN (e.g., miR-29a, miR125b o miR-150) y factores de transcripción comprometen la diferenciación de células B progenitoras (293,294). Además, la capacidad de las células del estroma de la médula ósea para liberar IL-7 (una citoquina importante para la supervivencia y proliferación de los precursores del linaje B) disminuye gradualmente, siendo este otro mecanismo para el desarrollo de células B progenitoras (295). Aunque la edad generalmente conduce a una disminución de la densidad celular de la médula ósea, la cantidad de células NK residentes en ella (296) y de macrófagos (297) tienden a aumentar

en las personas mayores, y se conoce que la senescencia no tiene ningún efecto aparente sobre las células pro-B, pre-B y B inmaduras (298).

El timo es un órgano linfoide central responsable de producir células T vírgenes, desempeñando un papel esencial en la inmunidad celular y humoral. El timo involuciona gradualmente con el envejecimiento, lo cual interfiere con la selección negativa y resulta en la liberación de células T autorreactivas que se activan en la periferia y producen citoquinas proinflamatorias de bajo nivel (e.g., TNF- α o IL-6) que conducen a inflamación crónica de bajo grado y daños a tejidos propios (enfermedades autoinmunes) (299). La involución tímica reduce las células T vírgenes y el repertorio de TCR (300). Además, las células T CD8 (especialmente las células T CD8+ citotóxicas) tienden a perderse en mayor medida que las células T CD4 (301). Los órganos linfoides periféricos también sufren el proceso de envejecimiento. El bazo envejecido regula positivamente la expresión de IL-6, altera el reclutamiento de células T e inhibe la fagocitosis de los macrófagos en la zona marginal (302). Los ganglios linfáticos muestran signos de envejecimiento, incluidos cambios de permeabilidad, agregación de células senescentes e inflamación, lo que influye negativamente en la migración y el reclutamiento de células inmunitarias (303), disminuye la inmunidad humoral (304) y condiciona una mayor susceptibilidad a las infecciones en los ancianos (305). Las células T/B vírgenes y las CD en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) se reducen también con la edad, lo que puede explicar el aumento de los cánceres gastrointestinales en los ancianos (306).

3.4. Factores ambientales y estilo de vida

Aunque el envejecimiento cronológico es uniforme e inmutable, la tasa de envejecimiento biológico es variable y modificable según la genética individual, la exposición ambiental y los comportamientos relacionados con la salud (307). Hasta no

hace muchos años, el mejor biomarcador de edad biológica era el acortamiento de los telómeros. Como ya hemos mencionado en apartados anteriores (ver subapartado 3.2.1), la longitud de los telómeros es un rasgo complejo que está determinado por una combinación de determinantes genéticos, epigenéticos y ambientales que se relaciona con la senescencia y el envejecimiento. De los factores ambientales y de estilo de vida, la longitud acortada de los telómeros se ha asociado con estrés psicológico (308), bajos niveles de actividad física (309), obesidad (310,311), tabaquismo (310) y nivel socioeconómico (312). Cassidy et al. (2010) encontraron que la circunferencia de la cintura, el IMC y la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados se asociaron inversamente con la longitud de los telómeros, mientras que una dieta rica en fibra (específicamente fibra de cereales) se asoció positivamente (313). Por su parte, Nettleton et al. (2008) encontraron que la ingesta de carne procesada se relacionó inversamente con la longitud de los telómeros (314). Así, la dieta es un comportamiento modificable con el potencial de mitigar el riesgo de enfermedades crónicas e influye en los factores de riesgo intermedios y en la prevalencia de las enfermedades relacionadas con la edad (315). Estos factores dietéticos incluyen cereales integrales y fibra dietética (313,316), pescado y ácidos grasos omega-3 (313,317) y frutas y verduras (318), todos ellos también potencialmente capaces de reducir la inflamación sistémica (319).

Se ha demostrado sistemáticamente que la restricción calórica prolonga la esperanza de vida y retrasa la aparición y progresión de diversas enfermedades relacionadas con la edad, incluida la sarcopenia (320). La restricción calórica es una intervención no farmacológica ni genética que consiste en reducir el aporte calórico diario (entre un 15% y un 60% de la ingesta calórica habitual) manteniendo una adecuada nutrición e hidratación, consiguiendo disminuir la tasa biológica de envejecimiento y aumentar la esperanza de vida tanto promedio como máxima (321,322).

La autofagia es una respuesta celular en etapa temprana a estímulos de estrés en situaciones tanto fisiológicas como patológicas. La evidencia acumulada sugiere que tanto el ayuno intermitente como la restricción calórica pueden conducir a la inducción de autofagia adaptativa y aumentar la longevidad de las células eucariota, mientras que la restricción calórica prolongada con una respuesta de autofagia excesiva es perjudicial (323). En los últimos años, el ayuno intermitente se ha convertido en una intervención dietética alternativa y popular que incluye diferentes patrones de alimentación, como el ayuno en días alternos (implica días durante los cuales no se consumen calorías y días de alimentación ad libitum), las dietas 5:2 o 4:3 (restricción calórica durante 2 o 3 días no consecutivos por semana y 5 o 4 días comiendo sin restricciones, respectivamente) y la alimentación con restricción de tiempo (intervalos de 12 o 16 horas donde se organizan las comidas y 12 u 8 horas donde se ayuna, respectivamente) (324,325). La restricción calórica antioxidante atenúa significativamente el factor nuclear κ B (NF- κ B), los factores de necrosis tumoral (TNF- α y TNF- β), las interleucinas (IL-1 β , IL-2 e IL-6), las quimiocinas (IL-8 y RANTES) y las moléculas de adhesión (AM) (320,326,327), así como modula enzimas como la NO sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), las cuales son proinflamatorias y se sabe que aumentan con la edad (328). En cualquier caso, estas dos intervenciones dietéticas han demostrado prolongar la vida útil al reducir la tasa metabólica y el daño oxidativo, mejorar la composición corporal (el peso corporal, el IMC, el porcentaje de grasa corporal, la grasa visceral y la circunferencia de la cintura), la inflamación, los marcadores glucémicos (reduce la resistencia a la insulina y la glucemia) y los perfiles de lípidos (disminuye el colesterol total, los triglicéridos, las lipoproteínas de bajo peso molecular o LDL y aumenta las de alto peso molecular o HDL) (321,325,329).

Uno de los mejores predictores de la edad biológica parece ser el reloj epigenético compuesto por la ADN_m, ya que se correlaciona bien con la edad y predice la mortalidad entre poblaciones (330). La aceleración de la edad epigenética es la diferencia entre la edad cronológica y la edad epigenética y representa el envejecimiento biológico acelerado (331). Los indicadores de aceleración epigenética de la edad de segunda generación, GrimAge (GrimAgeAccel) y PhenoAge (PhenoAgeAccel), han evolucionado para incorporar rasgos clínicos relacionados con el envejecimiento y se destacan en términos de predicción de mortalidad y morbilidad cardiometabólica relacionada con la edad (332–335). Así, mientras las edades epigenéticas de primera generación (edad de Horvath (336), edad de Hannum (337) y reloj sanguíneo y cutáneo (338)) seleccionan ADN_m según la edad cronológica, las edades epigenéticas de segunda generación (GrimAge y PhenoAge) (208,334) incorporan, además, biomarcadores clínicos.

Kong et al. (2023) encontraron robustas asociaciones entre 10 factores de riesgo y el aumento de GrimAgeAccel (339). El inicio del hábito de fumar fue el factor de riesgo más importante para GrimAgeAccel, seguido de una ingesta alta de alcohol, mayor circunferencia de la cintura, siestas durante el día, mayor porcentaje de grasa corporal, mayor IMC, niveles elevados de PCR, triglicéridos más altos, obesidad infantil y diabetes tipo 2 (339). Por el contrario, la educación en años de escolaridad y los ingresos del hogar fueron factores protectores asociados con una disminución de GrimAgeAccel. Por su parte, ocho factores de riesgo modificables mostraron fuertes asociaciones con PhenoAgeAccel incluyendo una mayor circunferencia de la cintura como el factor de riesgo más importante, seguido de un mayor porcentaje de grasa corporal, mayor IMC, inicio del tabaquismo, elevación de PCR, obesidad infantil y diabetes tipo 2 (339). La educación superior en años de escolaridad se asoció con una disminución de PhenoAgeAccel (339).

La educación parece ser el determinante más importante de salud, con amplias implicaciones para los comportamientos de estilo de vida de una persona a lo largo de su vida y el correcto empleo de los recursos que promueven la salud (340,341). Bountziouka et al. (2022) documentaron que cada aumento de 1 año en la educación se asocia con un aumento equivalente de 4,2 años relacionado con la edad en la longitud de los telómeros (342). En relación con el tabaquismo, encontraron que éste se asocia con una longitud de telómeros más corta (342). De la misma manera, la evidencia de la Encuesta Danesa de Entrevistas de Salud sugirió que la esperanza de vida de un fumador empedernido era de siete años más corta que la de alguien que nunca había fumado (343). Levine et al. (2018) demostraron que el tabaquismo tiene una huella epigenética que se refleja en los predictores de riesgo de ADNm, de manera que el hábito tabáquico (ajustado por paquetes/año) se relaciona con las morbilidades, el estado de funcionamiento físico, el tiempo libre de enfermedad y enfermedad coronaria (335). Además, encontraron que el aumento de un año en el DNAm (PhenoAge) ajustando por edad cronológica, raza/etnia, paquetes/año y estado de tabaquismo se asocia con un aumento del 5% en el riesgo de incidencia de cáncer de pulmón y/o mortalidad. En el mismo estudio, se demostró que el DNAm (PhenoAge) se relaciona con el ejercicio y los hábitos alimentarios, de modo que el aumento de ejercicio y los marcadores de consumo de frutas y verduras se asocian con un menor DNAm (PhenoAge) (335).

El efecto del consumo de alcohol sobre la salud, incluidas las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, es complejo y se ha discutido ampliamente (344). Anteriormente se pensaba que el consumo leve y moderado de alcohol tenía efectos protectores para las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2 (345,346). Sin embargo, metaanálisis recientes sugieren que no existe un nivel seguro de alcohol para la salud humana (347,348). Estas conclusiones vienen respaldadas con los últimos estudios de

asociación entre el alcohol y los marcadores de envejecimiento epigenéticos de metilación del ADN (339). Wang et al. (2023) encontraron una asociación entre el consumo promedio de alcohol a largo plazo y el aumento de GrimAgeAccel y PhenoAgeAccel en participantes de mediana edad (45 a 64 años, n=1866) y mayores (65 a 94 años, n=1267) siendo además esta relación lineal, mientras que no se observó asociación entre los adultos jóvenes (24 a 44 años, n=690) (349). Estos resultados en adultos jóvenes no son concordantes con los encontrados por Nannini et al. (2023) (350), hecho que podría explicarse por las diferencias entre razas, ya que Nannini et al. examinaron una cohorte similar de adultos jóvenes de ascendencia europea y africana, mientras que Wang et al. incluyeron estadounidenses de origen europeo (la cohorte de segunda y tercera generación del estudio Framingham). Además, los participantes más jóvenes tuvieron una menor exposición al alcohol en comparación con los participantes de mediana edad y mayores, un envejecimiento epigenético más débil debido a su menor edad y un nivel de estudios más alto en comparación con los otros dos grupos de edad.

Es ampliamente reconocido que la actividad física influye positivamente en la resistencia a los procesos de envejecimiento. Eckstrom et al. (2020), subrayaron los innumerables beneficios del ejercicio físico para las personas mayores que abarcan mejoras en la salud cardiovascular, reducción del riesgo de enfermedades crónicas o mejora de los niveles de salud mental (351). Glynn et al. (2017) indicaron además que el ejercicio físico sostenido podría desacelerar notablemente los impactos fisiológicos del envejecimiento, fomentando así un envejecimiento exitoso (352). Rogers et al. (2017) descubrieron que el ejercicio físico de alta intensidad podría ralentizar el proceso de debilitamiento en las personas mayores (353). Pabianek et al. (2020) también afirmaron la importancia del ejercicio físico, enfatizando su papel en la reducción de la pérdida muscular relacionada con la edad y la reducción del riesgo de enfermedades crónicas

(354). Estos estudios corroboran colectivamente el papel fundamental del ejercicio físico a la hora de retrasar el proceso de envejecimiento y promover un envejecimiento saludable.

Estudios recientes han destacado las asociaciones entre el sueño, la sedestación prologada y la actividad física con PhenoAgeAccel, acentuando la influencia del estilo de vida en el proceso de envejecimiento (355). Han et al (2023) evidenciaron que caminar/montar en bicicleta, dormir y la actividad física de moderada a vigorosa disminuyen la aceleración de PhenoAge, mientras que el comportamiento sedentario y la mala calidad del sueño aumenta PhenoAgeAccel (355). Han et al. (2018) informaron que la duración excesiva del sueño (> 8 horas/día, siendo el rango normal 6-8 horas/día) se asocia con un aumento de PhenoAgeAccel (356). Igualmente, Gkatzamanis et al. (2022) observaron que una mala calidad del sueño y la duración prolongada del mismo parecen tener una asociación negativa significativa con el envejecimiento saludable (357).

Wu et al. (2024) tomaron los datos de la Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (NHANES) entre 2007 y 2010 para realizar un estudio transversal entre 8 hábitos saludables y factores de salud: la dieta, la actividad física, la exposición a la nicotina, la salud del sueño, el IMC, los lípidos en sangre, la glucosa en sangre y la presión arterial (Life's Essential 8 o LE8) y su relación con PhenoAgeAccel (358). Este estudio ha revelado una correlación negativa significativa entre LE8 y PhenoAgeAccel, enfatizando la importancia de mantener un estilo de vida saludable para desacelerar el proceso de envejecimiento biológico.

En conclusión, los factores de riesgo modificables para el envejecimiento epigenético acelerado más determinantes parecen ser los indicadores de adiposidad, la baja educación y el tabaquismo, lo cual proporciona objetivos de intervención prometedores para un envejecimiento saludable. Dada la enorme carga inducida por la morbilidad y mortalidad

relacionadas con la edad debido a estos factores de riesgo modificables, se hacen prioritarias estrategias para reducir las desigualdades educativas, promover estilos de vida saludables y mejorar los rasgos cardiometabólicos para frenar la tasa de envejecimiento epigenético acelerado.

II. KLOTHO COMO AGENTE SUPRESOR DEL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

1. APROXIMACIÓN CONCEPTUAL

1.1. Descubrimiento de Klotho

La proteína Klotho, codificada por el gen Klotho, fue descubierta por Kuro-o et al. (1997) en un ratón transgénico denominado ratón kl/kl. Los ratones homocigotos para la mutación por inserción de un transgén manifestaron fenotipos que se asemejaban al envejecimiento prematuro en humanos, destacando la presencia de arteriosclerosis, osteoporosis, cambios cutáneos relacionados con la edad y calcificaciones ectópicas, una esperanza de vida corta, infertilidad, hipocinesia, crecimiento enlentecido, marcha anormal, grave atrofia del timo, enfisema, crecimiento atrófico de las células productoras de hormona del crecimiento, hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante en la hipófisis anterior, niveles ligeramente elevados de calcio en suero, hipoglucemia, y disminución de la producción de insulina en el páncreas, entre otras (359).

El ratón mutante fue bautizado como “Klotho”, en referencia a “Clotho”, una de las diosas Moiras que según la mitología griega hilaba el hilo de la vida en los humanos (360). La estructura del gen Klotho, es decir, el gen asociado con el fenotipo de envejecimiento, fue elucidada descubriéndose una delección en el alelo mutante (359). Se demostró que el gen Klotho se expresaba predominantemente en el riñón (túbulos contorneados distales) y el cerebro (plexo coroideo). Investigaciones adicionales predijeron que el producto génico era una proteína transmembrana de tipo I. Kuro-o y su grupo también lograron aislar el homólogo humano del gen Klotho, a través del aislamiento de ADN complementario (ADNc) humano que codifica una proteína con un

86% de similitud con la proteína del ratón. Dado que previamente no se habían asignado genes de síndromes de envejecimiento prematuro a la localización cromosómica del gen *Klotho*, esto representó un nuevo *locus* que podría influir potencialmente en el envejecimiento y sus manifestaciones, específicamente en humanos. De hecho, el ratón *Klotho* fue el primer modelo de animal de laboratorio en ese momento que tenía varios fenotipos que reflejaban el envejecimiento prematuro en humanos, causado por una mutación génica única.

Notablemente, dos cepas de ratones transgénicos con la delección homocigota del gen *Klotho* (i.e., dos cepas de ratones *kl/kl*) mejoraron significativamente con la expresión exógena del ADNc de *Klotho* (359). Esto ayudó a confirmar que el gen *Klotho* determinaba el mencionado fenotipo en ratones y ciertamente destacó el potencial de este modelo de ratón para proporcionar nuevas perspectivas sobre el envejecimiento humano y sus mecanismos subyacentes.

El potencial de alargar la vida de *Klotho* fue demostrado posteriormente en estudios realizados por Kurosu et al. (2005), donde los autores descubrieron que la sobreexpresión de *Klotho* en ratones implicaba una mayor esperanza de vida, independientemente de la dieta, el consumo de oxígeno o el nivel de crecimiento en comparación con los ratones salvajes (361). Interesantemente, la sobreexpresión de *Klotho* resultó en el desarrollo de resistencia a la insulina y al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1). Se pensó, por tanto, que la inhibición de la señalización de insulina e IGF-1 era un mecanismo por el cual *Klotho* desaceleraba el proceso de envejecimiento.

1.2. Genes Homólogos: β -*Klotho* y γ -*Klotho*

Existen tres homólogos de *Klotho*: α -*Klotho* (359), β -*Klotho* (362) y γ -*Klotho* (363), 2002). α -*Klotho* actúa como correceptor para el FGF23 y es necesario para que se den los

efectos biológicos inducidos por FGF23 (364). Forma complejos con los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) 1c, 3c y 4 en el riñón y en las glándulas paratiroides, actuando como receptores de alta afinidad para FGF23. En cambio, β -Klotho es necesario para la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19) y del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) (365,366). β -Klotho forma complejos con FGFR1c y 4 en el hígado y tejido adiposo, uniéndose principalmente a FGF19 y FGF21. Por último, γ -Klotho forma complejos con FGFR1b, 1c, 2c y 4, en el ojo, tejido conectivo y riñón, y se une a FGF19 (367). La secuencia de aminoácidos de β -Klotho es un 41,2% idéntica a la de α -Klotho (362). γ -Klotho comparte una identidad del 37–38% con las repeticiones internas de α -Klotho y β -Klotho (363).

1.3. Papel de α -Klotho en el envejecimiento

Desde la publicación de los hallazgos de Kuro-o et al. en 1997 y Kurosu et al. en 2005, se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos y roles de Klotho en relación al proceso de envejecimiento. Duce et al. (2008) observaron varios genes de interés a partir del análisis de microarrays de la materia blanca del cerebro de macacos rhesus asociados con el envejecimiento (368). En particular, hubo cambios relacionados con la edad en la expresión del gen Klotho, así como en el factor 1 de unión a repeticiones teloméricas y en la polimerasa gamma mitocondrial, todos ellos asociados con condiciones metabólicas que conducen a cambios degenerativos en el cerebro y a una vida útil reducida. Además, se encontró que la expresión del gen Klotho estaba regulada a la baja con la edad en la materia blanca del cerebro en aproximadamente 1,5 veces. Según los resultados del análisis de inmunotransferencia, la expresión de la proteína Klotho también se redujo significativamente con la edad (aproximadamente 2 veces). Cabe destacar que la expresión de Klotho solo se redujo en la materia blanca del cerebro

y no en la materia gris. Además, la materia blanca de los cerebros envejecidos de macacos rhesus mostró evidencia de mayor estrés oxidativo y neuroinflamación (368), lo que apunta a la pérdida de los efectos antioxidantes y protectores de Klotho.

Interesantemente, tras añadir Klotho recombinante a células progenitoras de oligodendrocitos primarios *in vitro*, se observó una maduración optimizada hacia oligodendrocitos mielinizantes (369). Además, los ratones *knockout* de Klotho mostraron una mielina anormal según la microscopía electrónica, con solo el 10% de los axones mielinizados en el nervio óptico en comparación con el 90% en los ratones normales (369). Experimentos en un modelo murino de desmielinización por cuprizona (un modelo de esclerosis múltiple) demostraron que Klotho tiene un papel crítico en la remielinización (370). Más tarde, se evidenció el efecto protector de Klotho en las neuronas, *in vitro* e *in vivo*, en modelos de ratones con enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (371–373). Chen et al. (2013) también encontraron que los ratones *knockout* de Klotho mostraban anomalías tanto en la materia gris como en la blanca del cerebro. Hubo evidencia de degeneración del hipocampo y pérdida de neuronas motoras.

En humanos, Yamazaki et al. (2010) fueron los primeros en desarrollar un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para medir los niveles de Klotho sérico circulante (374). Encontraron que este biomarcador estaba inversamente asociado con la edad en una cohorte de 181 voluntarios asiáticos sanos. Específicamente, los niños tenían niveles de Klotho estadísticamente significativos más altos que los adultos.

1.4. Isoformas de la proteína Klotho

Existen varias isoformas de Klotho, las cuales fueron inicialmente descubiertas por Shiraki-Iida et al. (1998). Este grupo identificó la estructura del gen Klotho del ratón, su

promotor y dos transcritos que codifican una forma de Klotho ya sea transmembrana o secretada (375). Posteriormente, Matsumura et al. (1998) aislaron el homólogo humano del gen Klotho, identificando dos transcritos que codifican la forma de Klotho transmembrana y la forma secretada de Klotho (376). Desde entonces, se ha determinado que Klotho tiene tres isoformas, dos producidas por empalme diferencial: (i) Klotho transmembrana de longitud completa (FL-Klotho) y Klotho secretada (Sec-Klotho), y una forma circulante producida por la escisión del FL-Klotho de la membrana (Sh-Klotho) (377–379). FL-Klotho tiene una secuencia de señal, seguida de dos dominios homólogos (KL1 y KL2) que comparten homología con las glicosidasas (380), un dominio transmembrana y un corto dominio intracelular (**Figura 3**).

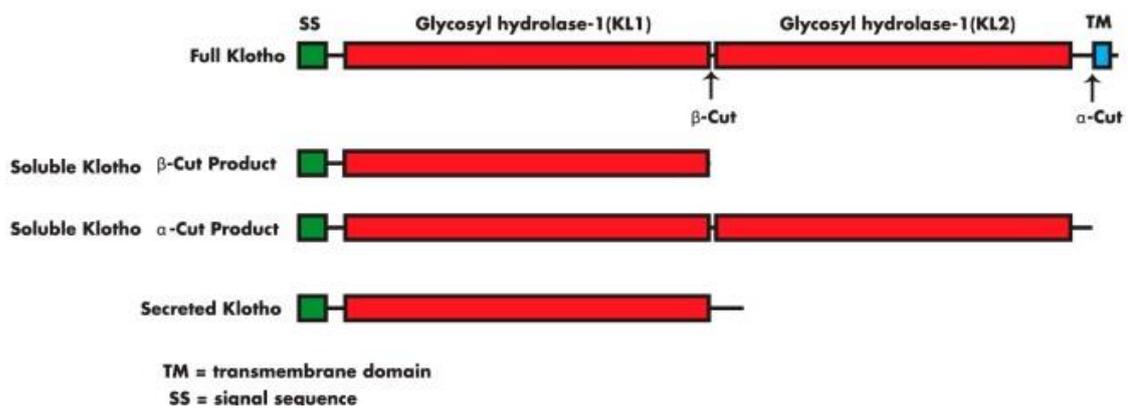


Figura 3. Arquitectura de la proteína Klotho humana. Extraída de (191).

FL-Klotho y Sh-Klotho actúan como correceptores para la señalización de FGFR1 y FGF23 en el riñón (ver **Figura 4**). Sh-Klotho también funciona como una hormona en tejidos distantes. Tanto la presencia como la liberación de Klotho son importantes para procesos de desarrollo, inflamatorios y patológicos en humanos (381–383).

1.5. Función de Klotho a nivel celular y molecular en condiciones homeostáticas y durante el proceso de envejecimiento

Klotho está involucrada en la señalización de FGF tal y como se ha indicado previamente (364). Tras su descubrimiento por parte de Kuro-o et al. (1997), Kurosu et al. (2006) demostraron que Klotho se une a varios FGFRs y es un cofactor necesario para la activación de la señalización de FGF23 (359). En células renales embrionarias humanas que expresan FL-Klotho (células 293KL), y que fueron transfectadas con vectores de expresión para varias isoformas de FGFR, Klotho se unió a FGFR1, FGFR3 y FGFR4 con alta eficiencia. Además, FGF23 se unió a FGFR1c, -3c y -4 sólo en presencia de Klotho.

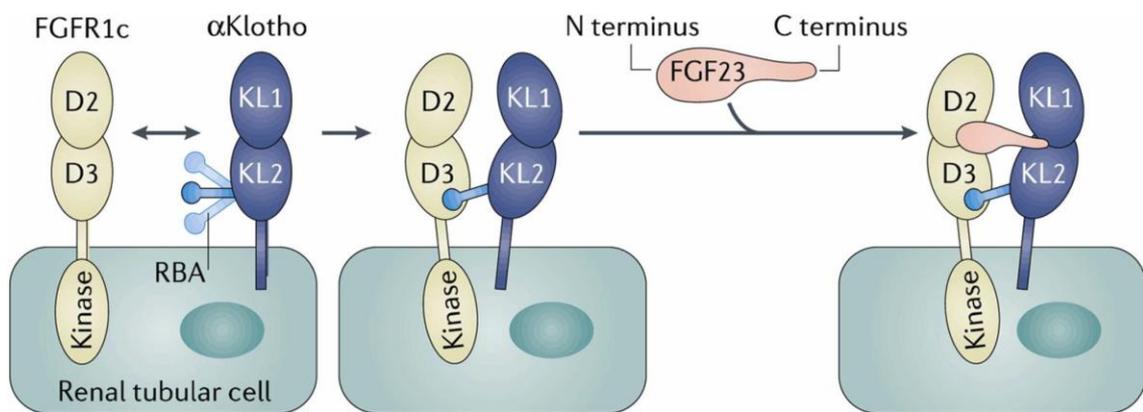


Figura 4. Complejo KL-FGF23-FGFR1c. Este esquema muestra cómo Klotho se une a FGFR1c para la señalización de FGF23. El dominio KL2 de Klotho tiene un brazo de unión al receptor (RBA) que se une al dominio D3 de FGFR1c. FGF23 luego encaja en una hendidura generada después de la unión de Klotho y FGFR1c. Figura tomada de (384).

Sin embargo, el dominio extracelular de Klotho de forma aislada no fijó a FGF23, lo que sugiere que FGF23 se une preferentemente al complejo KL-FGFR en lugar de KL o FGFR por separado. Además, FGF23 no indujo la fosforilación de FRS2a o ERK1/2 en células HEK-293, pero sí se observó fosforilación en células 293KL, lo cual indica que

Klotho aumenta la sensibilidad celular a FGF23. Tanto el dominio extracelular de Klotho como FL-Klotho se unieron a los FGFR expresados exógenamente de la misma manera, hecho que permitió concluir que tanto FL-Klotho como el dominio extracelular de Klotho son cofactores necesarios para una señalización eficiente de FGF a través de FGF23. Por último, se puso de manifiesto que en células ováricas de modelos animales que expresaban FL-Klotho, estas desarrollaban la capacidad de responder a FGF23. En conjunto, estos hallazgos muestran que Klotho es necesario para la iniciación de la señalización de FGF por FGF23, específicamente a través de la unión a FGFR1c, 3c y 4. Debido a que Klotho se expresa en los túbulos contorneados distales del riñón y el dominio extracelular de Klotho se libera y es soluble, se sugirió que Klotho actúa en los túbulos proximales adyacentes y contribuye a la inhibición de la reabsorción de fosfato, una función conocida de FGF23 (359).

1.5.1. Funciones y mecanismos de Klotho soluble (S-Klotho)

S-Klotho se ha relacionado estrechamente en la señalización de insulina e IGF-1 (385). Kurosu et al. (2005) encontraron que S-Klotho suprime la autofosforilación estimulada por el ligando de los receptores de insulina e IGF-1 de manera dependiente a la dosis. Además, inhibe la activación de cascadas de activación del receptor, como la fosforilación de tirosina del sustrato del receptor de insulina 1 y 2 y la asociación de la subunidad p85 de la fosfoinositol 3-quinasa con las proteínas sustrato del receptor de insulina. Kurosu et al. (2005) también encontraron que al inhibir la señalización de insulina e IGF-1 se mejoraba la supervivencia y se aliviaban las patologías relacionadas con la edad en los ratones.

S-Klotho podría tener un papel importante en el desarrollo del cáncer, una enfermedad asociada con el proceso de envejecimiento. Hay varios estudios que sugieren que la vía

de señalización de insulina/IGF-1 puede afectar a la proliferación celular, la apoptosis y el cáncer (385–387). Pollak et al. (2004) han sugerido que el crecimiento celular de algunas células cancerosas es estimulado por la IGF-1 o la IGF-2 de forma endocrina, autocrina o paracrina (387). Ray et al. (2014) encontraron que el tratamiento de la diabetes con insulina o secretagogos de insulina aumenta el riesgo de desarrollar algunos tipos de tumores (386). A nivel molecular, la unión de insulina e IGF-1 a sus receptores respectivos activa las proteínas sustrato del receptor de la insulina, las cuales activan vías de señalización que regulan el desarrollo y el mantenimiento celular normal (e.g., vías de PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2) (386). Por lo tanto, los defectos en estas vías podrían contribuir al crecimiento celular anormal y, por lo tanto, al cáncer.

También se ha vinculado a S-Klotho con procesos de estrés oxidativo en mamíferos, específicamente en vías que involucran a la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa. Yamamoto et al. (2005) reportaron que en células HeLa tratadas con paraquat (un agente que genera superóxido), la administración de S-Klotho inhibió la oxidación lipídica inducida por paraquat (383). Además, en células tratadas con paraquat, el tratamiento con S-Klotho inhibió la apoptosis de forma similar a lo observado en células HeLa. Se postuló, por tanto, que S-Klotho confiere un grado de resistencia al estrés oxidativo en las células de mamíferos. Yamamoto et al. (2005) también estudiaron la base molecular de esta resistencia, demostrando que el tratamiento con S-Klotho resultó en niveles elevados de superóxido dismutasa 2 (SOD2) *in vitro* en células HeLa e *in vivo* en ratones (383). Esto se encontró como resultado de la supresión de la señalización de insulina/IGF-1/PI3K/Akt, lo que permitió la activación de los factores de transcripción FoxO *forkhead* (FOXOs), los cuales aumentaron la expresión de SOD2 (388). De hecho, S-Klotho redujo la fosforilación de Akt y FOXO en las células HeLa, indicando una mayor activación de los FOXOs. Dado que SOD2 está involucrado activamente en la eliminación de especies

reactivas de oxígeno, se pensó que Klotho confería cierto nivel de resistencia al estrés oxidativo al modular los niveles de SOD2 (388). Otra enzima, la catalasa, también elimina especies reactivas de oxígeno y se ha encontrado que su sobreexpresión prolonga la vida en ratones (389).

1.5.2. Señalización de Klotho mediante fosforilación

Estudios experimentales también han demostrado que la señalización de Klotho se realiza a través de la fosforilación. Wolf et al. (2008) describieron el efecto de Klotho en la activación de la vía de IGF-1 en células de cáncer de mama MCF-7, las cuales expresan niveles elevados del receptor de IGF-1 (IGF-1R) (389). También se estudiaron células de cáncer de mama MDA-MB-231, las cuales expresan niveles más bajos de IGF-1R. Curiosamente, la sobreexpresión de Klotho en estas células se asoció con una reducción en la fosforilación de IGF-1R y sus vías incluyendo ERK1 y ERK2. En esencia, la sobreexpresión de Klotho inhibió la señalización de IGF-1. Se observaron efectos similares en la vía de la insulina en las células MCF-7. El tratamiento con Klotho también inhibió la fosforilación y activación del IGF-1R en células MCF-7. Además, la inhibición de Klotho en células MCF-7 produjo un aumento estadísticamente significativo de 2,2 veces en la fosforilación de Akt tras la estimulación con IGF-1. La sobreexpresión de Klotho también redujo la fosforilación de ERK1 y ERK2 en células HEK-293, indicando que Klotho inhibió la activación de la vía de FGF (389).

Años más tarde, en 2013, Chen et al. reportaron que las proteínas en las vías de ERK1/2 y Akt se fosforilaron en las células progenitoras de oligodendrocitos de ratas después del tratamiento con Klotho (369). El sustrato del receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FRS2) también se fosforiló tras el tratamiento con Klotho, implicando aún más a esta proteína en la señalización de FGF. Especialmente, cuando las células

progenitoras de oligodendrocitos fueron tratadas con S-Klotho en presencia de inhibidores de Akt y ERK, la inhibición de ERK redujo y la inhibición de Akt eliminó por completo los efectos de Klotho en la maduración de las células progenitoras de oligodendrocitos, lo que indica que Klotho mejoró la maduración de las células progenitoras de oligodendrocitos a través de las vías de señalización de Akt y ERK1/2. Chen et al. (2013) también estuvieron interesados en identificar los posibles factores de transcripción involucrados en la maduración inducida por Klotho de las células progenitoras de oligodendrocitos (369). Se observó en este sentido que el tratamiento con Klotho llevó a un aumento en la fosforilación del factor de transcripción STAT3, lo que resultó en una mayor actividad de STAT3.

Finalmente, la fosforilación inducida por Klotho en la vía de PI3K/Akt se ha vinculado con la fosforilación inhibitoria del factor de transcripción *forkhead box O3a*, FOXO3a, y la inducción de la peroxiredoxina-2 (369). La administración de Klotho exógena aumentó la fosforilación tanto de las vías de PI3K/Akt como de ERK en las neuronas hipocámpales primarias de ratas, tras sólo 15 minutos después del tratamiento con Klotho.

1.5.3. Papel de Klotho en el retículo endoplásmico y la autofagia

Un campo de estudio emergente aborda el papel de Klotho sobre las respuestas al estrés del retículo endoplásmico y la autofagia. Investigaciones de Banerjee et al. (2013) ponen de manifiesto que la sobreexpresión de Klotho atenúa los marcadores de estrés del retículo endoplásmico (e.g., IRE1, XBP-1s, BiP, CHOP, JNK y p38) en células tratadas con inductores de estrés (390). Este efecto se observa tanto en células renales como en células epiteliales alveolares. Por otro lado, el silenciamiento de Klotho intensifica la expresión de estos marcadores en respuesta al estrés.

Además, estudios de Mytych et al. (2019) examinaron el impacto del silenciamiento de Klotho en fibroblastos humanos expuestos a lipopolisacárido (LPS) (391). El silenciamiento de Klotho desaceleró significativamente la cicatrización de heridas, aumentó la detención del ciclo celular, disminuyó la actividad metabólica y provocó la activación de la apoptosis y la inestabilidad genómica. En contraste, las células con sobreexpresión de Klotho exhibieron mayor supervivencia celular y resistencia al estrés.

Estas investigaciones indican que Klotho desempeña un papel clave sobre la modulación de las respuestas al estrés del retículo endoplásmico y la autofagia, lo que podría contribuir a sus efectos protectores y antienvjecimiento, respectivamente. Se sugiere que Klotho regula la expresión de genes relacionados con la autofagia y la señalización de IGF-1/PI3K/Akt/mTOR, proporcionando una base para comprender los mecanismos subyacentes de los beneficios de Klotho en procesos celulares críticos.

1.5.4. Regulación a la baja de la expresión de Klotho durante el envejecimiento

Los mecanismos mediante los cuales se regula a la baja la expresión del gen Klotho también han sido objeto de estudio por parte de diversos grupos de investigación. King et al. (2012) reportaron que en macacos rhesus de edad avanzada, los niveles de proteína Klotho se redujeron en un 20% en la materia blanca (pero no en la gris) de la corteza prefrontal dorsolateral, en comparación con jóvenes (392), hallazgos que son consistentes con los obtenidos por Duce et al. (2008) (392). Además, King et al. (2012) demostraron un aumento estadísticamente significativo del 0,4% en la metilación del promotor de Klotho en la materia blanca de la corteza prefrontal dorsolateral de macacos rhesus de edad avanzada, en comparación con monos jóvenes (392). Estos resultados respaldan la idea de que los niveles de Klotho son modificados epigenéticamente, al menos en la materia blanca de estos animales. Es importante destacar que Lee et al. (2010)

encontraron que la pérdida completa de ARNm de Klotho ocurre en la fase tardía de la tumorigénesis del cáncer cervical *in vitro*, y que esto se asoció con la hipermetilación del promotor de Klotho (393). De manera similar, Pan et al. (2011) encontraron que la expresión del gen Klotho estaba ausente o regulada a la baja en el cáncer de colon *in vitro*, y esto también se asoció con la hipermetilación del promotor de Klotho (394).

Recientemente, Kuro-o (2021) describió un posible mecanismo mediante el cual la deficiencia de Klotho podría llevar a un envejecimiento acelerado (395). Es ampliamente conocido que los ratones deficientes en Klotho presentan un síndrome que refleja el envejecimiento en humanos (395). También se sabe que Klotho es necesario para la señalización de FGF23 (395). Dado que FGF23 facilita el aumento de la excreción urinaria de fosfato, los ratones con deficiencia de Klotho se enfrentan tanto a un proceso de envejecimiento acelerado como a una retención de fosfato. Dado que el fluido extracelular está sobresaturado en iones fosfato y calcio, una concentración de fosfato aumentada puede dar lugar a la precipitación de fosfato de calcio, el cual subsecuentemente adsorbido por la proteína sérica fetuina-A para formar partículas calciproteicas (CPP), que pueden causar daño celular, calcificación e inflamación. Por lo tanto, la falta de Klotho puede llevar a niveles elevados de CPP, lo que en última instancia puede contribuir al envejecimiento.

2. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE KLOTHO

2.1.Envejecimiento

Klotho ha demostrado desempeñar un papel crucial en el envejecimiento una y otra vez desde su descubrimiento inicial por Kuro-o et al. (1997) (359). De hecho, se ha demostrado de manera consistente que los niveles de Klotho disminuyen con la edad y que la preservación de niveles elevados de Klotho puede prolongar la esperanza de vida y proporcionar protección contra enfermedades relacionadas con la edad (396). Se ha reportado ampliamente que los niveles séricos de Klotho disminuyen con la edad en humanos (397) y en chimpancés (398). Del mismo modo, se ha descubierto que los niveles de Klotho son más bajos en pacientes mayores con enfermedad de Alzheimer en comparación con aquellos sin dicha patología y más bajos en adultos mayores en comparación con adultos jóvenes (399). En las subsecciones siguientes, se amplía cómo se modulan los niveles de Klotho en diversas enfermedades, todas ellas asociadas al proceso de envejecimiento.

2.2.Patología renal

Dado que Klotho es sintetizada fundamentalmente en los riñones, una de las principales áreas de interés es el papel de Klotho en la patología renal. Se ha demostrado que el número y tamaño de los glomérulos, así como la filtración del riñón, disminuyen significativamente con la edad (400). Además, se producen cambios hemodinámicos y bioquímicos en este órgano con la edad que predisponen aún más al padecimiento de estas enfermedades (401). De hecho, la incidencia de esclerosis glomerular aumenta con la edad (402).

Así, las implicaciones de Klotho en el manejo clínico de las afecciones renales son variadas (396). La mayor expresión de FL-Klotho se encuentra en los riñones, donde el componente promotor del gen Klotho está en gran medida sin metilar en las células tubulares renales, en comparación con el 30–40% de metilación en células que no expresan Klotho (403). De particular interés es el uso de S-Klotho como biomarcador en enfermedades renales. Wang et al. (2018) realizaron un metaanálisis de nueve estudios con 1457 pacientes con enfermedad renal crónica concluyendo que los niveles de S-Klotho estaban positivamente asociados con la tasa de filtración glomerular estimada, un indicador de la función renal e inversamente con los niveles de FGF23 (404). Mientras que niveles altos de FGF23 pueden producir efectos tóxicos, S-Klotho puede suprimir los niveles de FGF23, promoviendo así una función renal fisiológica (405). Los efectos perjudiciales derivados de niveles elevados de FGF23 incluyen alteraciones en el proceso de vasodilatación y la inducción de hipertrofia ventricular izquierda (406). En conjunto, estos hallazgos sugieren que S-Klotho podría utilizarse potencialmente como biomarcador de la función renal.

Además, Klotho tiene potencial como terapia en afecciones renales. De hecho, Zhou et al. (2015) pusieron de manifiesto que, en ratones sometidos a nefrectomía 5/6, la expresión exógena de Klotho *in vivo* mediante administración génica basada en hidrodinámica redujo los niveles de albuminuria y creatinina sérica, lesiones morfológicas y mediadores del sistema renina-angiotensina, reflejando efectos protectores sobre la función renal (407). La presión arterial sistólica y la presión arterial media también se normalizaron en estos ratones tras la expresión exógena de Klotho.

El uso de Klotho como biomarcador para la función renal y tratamiento de enfermedades renales es, por tanto, de gran interés.

2.3. Patología cardiovascular

Klotho (KL) también tiene un gran potencial para modular el manejo clínico de las enfermedades cardiovasculares, las cuales también están asociadas con el envejecimiento. Con el aumento de la edad, la elasticidad del corazón y su capacidad para responder a cambios disminuyen (408). El aumento de la resistencia vascular amplifica la cantidad de trabajo necesario para que el corazón bombee sangre al resto del organismo. La angina de pecho, los síndromes coronarios agudos, la insuficiencia cardíaca y las arritmias aumentan en frecuencia entre las poblaciones mayores.

Existe evidencia previa de que Klotho puede proteger contra alteraciones cardiovasculares al regular el transporte iónico, la función endotelial, la inflamación, la homeostasis lipídica y el estrés oxidativo (408). En una cohorte de pacientes en hemodiálisis que estaban en riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares, los niveles séricos de S-Klotho fueron significativamente menores en comparación con pacientes con enfermedad renal crónica no dializados o controles saludables (409). Los pacientes con niveles más altos de S-Klotho tuvieron menos eventos cardiovasculares y mayor tasa de supervivencia en comparación con aquellos que tenían niveles más bajos. Entre los pacientes con bajos niveles de S-Klotho, se observaron más eventos cardiovasculares y una menor supervivencia, especialmente cuando los niveles séricos de FGF23 también eran altos.

En ratones, se ha descubierto que Klotho confiere cardioprotección mediante la regulación a la baja de los canales de calcio TRPC6 en el corazón (410). Recientemente, Sun et al. (2022) llevaron a cabo un estudio de randomización mendeliana para evaluar la relación causal entre las concentraciones de S-Klotho y enfermedades cardiovasculares, específicamente enfermedad arterial coronaria, fibrilación auricular, insuficiencia cardíaca y accidente cerebrovascular (411). Cinco polimorfismos de un solo

nucleótido se asociaron con los niveles circulantes de S-Klotho y explicaron el 7,68% de la varianza en las concentraciones circulantes de S-Klotho. En el metaanálisis, se reportó que por cada unidad de aumento en S-Klotho circulante, hubo un 3-5% menos de probabilidades de las anteriormente mencionadas patologías cardiovasculares.

2.4. Patología pulmonar

La investigación sobre Klotho también se puede extender al ámbito de las enfermedades pulmonares. Con el envejecimiento, el volumen de la cavidad torácica disminuye, la capacidad pulmonar se reduce y los músculos que facilitan la respiración se sufren hipotrofia severa (412). Cabe destacar que la eliminación de partículas del pulmón a través del elevador mucociliar también se ve reducida. Como resultado, las personas mayores son vulnerables al desarrollo de patologías pulmonares. De hecho, la prevalencia de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es especialmente alta en adultos mayores (413).

Batlahally et al. (2020) estudiaron a recién nacidos prematuros nacidos antes de las 29 semanas de gestación y encontraron que aquellos con displasia broncopulmonar e hipertensión pulmonar tenían niveles significativamente más bajos de S-Klotho en sangre de cordón en comparación con aquellos sin dicha patología (414). Además, Huang et al. (2020) propusieron a KL como un posible regulador de múltiples procesos patológicos subyacentes en la fibrosis pulmonar idiopática (415). Los fibroblastos pulmonares aislados de ratones expuestos a bleomicina (modelo de fibrosis pulmonar idiopática) mostraron niveles reducidos de ARNm y KL, y la administración exógena de Klotho recombinante demostró aliviar la fibrosis pulmonar *ex vivo* promoviendo la activación y migración de los fibroblastos pulmonares, la formación de matriz extracelular y la

expresión de genes fibrosos conocidos. Será interesante evaluar si este tipo de terapia, cuando esté disponible, tiene efectos beneficiosos en los humanos.

2.5.Estados Metabólicos/Endocrinos Disfuncionales

El sistema endocrino también experimenta cambios durante el proceso de envejecimiento. Esto incluye alteraciones en los patrones de secreción y la sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario (416). Además, se ve afectada la homeostasis de la glucosa, disminuye la masa ósea y muscular y aumenta la masa grasa. Dado que el eje hipotálamo-hipofisario tiene diversos órganos diana, pueden ocurrir múltiples efectos descendentes a medida que se envejece. De hecho, la resistencia a la insulina aumenta y la función de los islotes pancreáticos disminuye con la edad, siendo la diabetes altamente prevalente en adultos mayores (417).

Subfamilias de Klotho se han visto implicadas en alteraciones del sistema endocrino y el metabolismo. Lan et al. (2017) esclarecieron aún más el papel de FGF19, FGF21 y β -Klotho en la regulación del peso corporal y los niveles de glucosa en sangre (418). Descubrieron que β -Klotho (correceptor de FGF19 y FGF21) es necesario para que ambas moléculas reduzcan el peso, la glucosa y los niveles de insulina, específicamente en neuronas, no en adipocitos ni hepatocitos. Además, BonDurant et al. (2017) encontraron que los ratones sin β -Klotho en el tejido adiposo carecían del efecto agudo de sensibilización a la insulina de FGF21 (419). En general, parece evidente que β -Klotho desempeña un papel significativo en el mantenimiento de la homeostasis metabólica y que los defectos con la proteína misma o las vías en las que está involucrada pueden estar vinculados a estados metabólicos/endocrinos alterados, como la obesidad y la diabetes, especialmente en poblaciones mayores.

2.6. Cáncer

Klotho también es conocida por sus propiedades antitumorales. Esto es importante, ya que la incidencia de la mayoría de los tipos de cáncer aumenta con la edad y los niveles de Klotho disminuyen durante el proceso de envejecimiento (368).

ONCOMINE es una herramienta que puede utilizarse para estudiar la expresión génica diferencial en múltiples tipos de cáncer. Es esencialmente una base de datos de microarrays que recopila resultados de análisis de expresión génica en cáncer realizados por investigadores de todo el mundo (420). Se ha descubierto que Klotho está regulado a la baja en casi todos los tipos de cáncer en la base de datos de ONCOMINE (de www.oncomine.org). De hecho, Chen et al. (2015) realizaron una búsqueda detallada en la base de datos, encontrando que la expresión génica de Klotho está significativamente disminuida en muchos tipos de cáncer, destacando cerebro, vejiga, pulmón, mama, próstata, piel, células germinales masculinas, glándula salival, páncreas, células T, cabeza y cuello, ovario y médula ósea (421). Los únicos tipos de cáncer en los que los niveles de Klotho no cambiaron significativamente fueron los de tiroides y células B. Al estudiar específicamente los cánceres cerebrales, se encontró que la expresión génica de Klotho estaba significativamente reducida en glioblastoma, oligodendroglioma y astrocitoma, en comparación con los controles (421). Los resultados de Chen et al. (2015) también resaltan el potencial pronóstico de Klotho en el ámbito del cáncer de mama. Una regulación descendente más severa de la expresión génica de Klotho se asoció con un peor pronóstico.

El objetivo principal del estudio realizado por Chen et al. (2015) fue investigar los efectos del tratamiento con Klotho en una línea híbrida de células oligodendrocíticas humanas, conocida como células MO3.13. Curiosamente, en una búsqueda de 1186 conjuntos de genes, se encontró que los genes de firma diferencial de las células tratadas

con Klotho eran similares a los observados en cáncer, enfermedad cardiovascular, estrés, envejecimiento y alteraciones bioquímicas y genéticas relacionadas con hormonas (421). En conjunto, estos resultados sugieren que Klotho tiene un papel muy importante en multitud de estados fisiológicos, incluyendo el cáncer, el estrés y el envejecimiento.

2.7. Enfermedades neurodegenerativas

Klotho también tiene muchas implicaciones en el ámbito de las enfermedades neurodegenerativas (396,422).

Se ha reportado que la expresión de Klotho es diez veces mayor en el cerebro que en el riñón (423), aunque estos resultados aún no han sido replicados. Massó et al. (2015) encontraron que los niveles de proteína S-Klotho disminuyen con la edad en ratones y que los niveles de transcripciones de ARN para Klotho disminuyeron aún más rápidamente en un modelo de ratón de Enfermedad de Alzheimer (423). En cuanto a la investigación en humanos, Semba et al. (2014) encontraron que los niveles de Klotho en el líquido cefalorraquídeo son más bajos en pacientes mayores con Alzheimer en comparación con controles (423). Dubal et al. (2015) reportaron que aumentar la expresión de Klotho en ratones transgénicos con proteína precursora de amiloide humana redujo la mortalidad prematura, disminuyó la ocurrencia de actividad anormal en el electroencefalograma intracraneal, mejoró el rendimiento cognitivo y conductual en la prueba del laberinto acuático de Morris, la prueba de reconocimiento de objetos novedosos, la prueba de evitación pasiva, la prueba de campo abierto y el laberinto elevado en cruz y previno la degeneración de las espinas dendríticas (423).

In vitro, se demostró que la adición de Klotho a neuronas primarias de ratón protegía a las células del estrés oxidativo inducido por glutamato y de los efectos tóxicos del péptido β amiloide oligomérico (conocido por ser neurotóxico, sinaptotóxico y uno de los

iniciadores de la neurodegeneración en Alzheimer) (423). El estudio proporcionó evidencia de que los efectos neuroprotectores de Klotho estaban mediados a través de la regulación del sistema redox (tioredoxina/peroxirredoxina [Trx/Prx]). La fosforilación inducida por Klotho de la vía PI3K/Akt (una vía importante en la apoptosis y longevidad), se asoció con una fosforilación inhibitoria sostenida del factor de transcripción *forkhead box O3a*, FOXO3a, esencial para la inducción de Prx-2.

En relación a la enfermedad de Parkinson, Sancesario et al. (2021) encontraron que los niveles séricos de S-Klotho eran significativamente más bajos en estos pacientes respecto a los controles emparejados por edad, pero que los niveles de Klotho en el líquido cefalorraquídeo eran significativamente más altos en los mismos pacientes en comparación con los controles (424). El 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es una neurotoxina conocida por inducir características de la enfermedad de Parkinson y afectar las neuronas dopaminérgicas (425). Brobey et al. (2015) encontraron que los ratones transgénicos que sobreexpresaban Klotho tenían menos pérdida de dopamina estriatal y de neuronas dopaminérgicas nigrales en respuesta al MPTP, en comparación con ratones de tipo salvaje (426). También se reveló que la neuroprotección conferida por Klotho es, en parte, coordinada a través de la vía ASK1/p38 MAPK.

Los hallazgos de Baluchnejadmojarad et al. (2017) resaltan aún más el potencial clínico de Klotho en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (427). En su trabajo, se encontró que la proteína Klotho mejoraba el comportamiento motriz en un modelo animal de enfermedad de Parkinson, disminuía los niveles estriatales de compuestos perjudiciales para la salud neuronal como la α -sinucleína y prevenía la neurodegeneración de las neuronas positivas para la tirosina hidroxilasa en la *pars compacta* de la sustancia *nigra*.

Por último, se ha relacionado a la proteína Klotho con el pronóstico de la esclerosis lateral amiotrófica en ratones con una sustitución de glicina 93 por alanina con ganancia de función en la SOD1. Zeldich et al. (2019) reportaron que en este modelo de ratón SOD1 de ELA, la sobreexpresión de Klotho retrasó el inicio y la progresión de la ELA y prolongó la supervivencia (371). Klotho también disminuyó la expresión de marcadores neuroinflamatorios y citocinas proinflamatorias, como el TNF- α , la subunidad alfa de la interleucina-12 (IL-12 α) y la interleucina-1 beta (IL-1 β), previno la pérdida neuronal, favoreció la promielinización y aumentó la expresión de factores antioxidantes.

3. KLOTHO COMO BIOMARCADOR PRONÓSTICO

Dadas las amplias implicaciones clínicas de Klotho al disminuir durante el envejecimiento y las enfermedades asociadas, restaurar o potenciar su síntesis endógena o suplementarlo exógenamente tiene un altísimo potencial terapéutico.

Utilizar Klotho como agente terapéutico en el cáncer parece ser una perspectiva prometedora. Wolf et al. (2008) exploraron esta posibilidad en el contexto del cáncer de mama (382) y Abramovitz et al. (2011) en el del cáncer de páncreas (428). Para este último, se observó que Klotho estaba infraexpresado en el adenocarcinoma pancreático, y que el tratamiento con S-Klotho redujo significativamente el crecimiento de células cancerosas pancreáticas *in vitro* e *in vivo*. El tratamiento con Klotho también aumentó significativamente la actividad del quimioterapéutico común 5-FU *in vitro*. Por lo tanto, se necesitó menos 5-FU cuando se administró con Klotho, reduciendo los efectos secundarios no deseados del fármaco. Cabe destacar que el dominio KL1 tuvo una actividad similar a FL-KL, pero con un perfil de seguridad más deseable *in vivo* porque no potenciaba la señalización de FGF23. Recientemente, Rubinstein et al. (2021) exploraron el papel de Klotho como supresor tumoral en el adenocarcinoma ductal de páncreas (429). La inhibición de Klotho pancreático y la mutación Kras en un nuevo modelo de ratón genético contribuyeron a la progresión y mortalidad del cáncer, mientras que la administración de partículas de virus adenoasociado con S-Klotho en un modelo de xenoinjerto redujo la carga tumoral pancreática y la administración de S-Klotho recombinante en un modelo de ratón establecido de adenocarcinoma ductal de páncreas mejoró la supervivencia. Estos hallazgos respaldan la inclusión de Klotho (y sus dominios) en el desarrollo de nuevos enfoques diagnósticos y terapéuticos para el cáncer.

En general, el potencial uso de Klotho como tratamiento es muy prometedor. En el futuro, Klotho se podrá utilizar junto con otros tratamientos médicos y cambios en el estilo de vida para aliviar sustancialmente la carga de patologías asociadas al envejecimiento.

Asimismo, considerando todo lo mencionado anteriormente, Klotho tiene un potencial muy prometedor como biomarcador pronóstico de diversas patologías. Por ejemplo, Abramovitz et al. (2011) encontraron que la expresión de Klotho se reduce en el adenocarcinoma pancreático (429), mientras que Wolf et al. (2008) encontraron una reducción en la expresión de Klotho en el cáncer de mama (429).

El uso de Klotho como biomarcador es especialmente importante en el diagnóstico y manejo de enfermedades relacionadas con la edad, ya que estas condiciones pueden permanecer latentes durante largos períodos y no tener signos y síntomas evidentes. Por lo tanto, la utilización de Klotho como un nuevo biomarcador puede ser extremadamente valiosa, especialmente en los esfuerzos para respaldar servicios de salud preventivos y de detección.

III. EJERCICIO FÍSICO, ENVEJECIMIENTO Y KLOTHO

1. PREFACIO

Considerando todo lo argumentado en el apartado anterior, parece sensato entender Klotho como un biomarcador robusto del estatus general de un individuo y un potencial tratamiento para varias enfermedades (364,430–436). En resumen, además de presentar propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (383,437,438), Klotho aumenta la afinidad de los FGFs 19, 21 y 23 con sus receptores respectivos (384). Por otro lado, el eje FGF23-Klotho actúa suprimiendo la reabsorción renal de fosfato inorgánico y activando la biosíntesis de vitamina D (384). Esta vía previene la formación de calciproteínas y, por ende, reduce el daño cardiorrenal (384,439). Además, la inflamación y la disfunción cardíaca provocadas por el envejecimiento se asocian con una deficiencia parcial de Klotho (440), proponiéndose que parte de este mecanismo se debe a la capacidad de Klotho para regular el metabolismo energético e inducir la expresión de enzimas antioxidantes, incluyendo la catalasa y el superóxido dismutasa (441,442).

Estudios previos han demostrado que la suplementación con Klotho mejora la presión arterial y parámetros renales en un modelo preclínico de diabetes tipo 2 (439,443), ejerciendo también acciones antiinflamatorias y optimizando la función cardíaca en ratones ancianos y endotoxémicos (440). Zhang et al. demostraron que el receptor activado por proliferadores de peroxisomas- γ (PPAR- γ) aumenta la expresión de Klotho, mientras que el antagonista de PPAR- γ inhibe Klotho en el riñón de ratones (444). Curiosamente, el ejercicio físico promueve la activación de PPAR- γ en el músculo esquelético y otros tejidos (445–447), lo que podría estar explicado por un incremento de los niveles circulantes de Klotho en diferentes poblaciones.

El ejercicio físico induce la secreción de Klotho por el músculo esquelético (448), junto con otras moléculas tales como la irisina (449), la sestrina-2 (449) y una variedad de microARN (449). Las moléculas producidas y secretadas por tejidos y órganos como consecuencia directa o indirecta del ejercicio se llaman exerquinas (450,451). Debido a su potencial terapéutico como miméticos del ejercicio, las exerquinas abren una nueva vía para el descubrimiento de medicamentos (450–453). Aunque Klotho tiene un potencial terapéutico prometedor en la patología humana, nunca se había considerado como una exerquina hasta la fecha. Por lo tanto, conocer los efectos del ejercicio físico en la expresión y secreción de S-Klotho puede ayudar a científicos, clínicos y expertos en ciencias del deporte a prescribir los mejores protocolos para aumentar los niveles de esta proteína.

En los últimos años, el interés de la comunidad científica y la industria en la posibilidad de imitar o potenciar los efectos del ejercicio ha aumentado considerablemente (454,455). En este contexto, las exerquinas se han posicionado como tratamientos o estrategias alternativas para mejorar la salud y/o el rendimiento (450,451). Aunque es una idea con importantes potenciales aplicaciones, aún queda un largo camino antes de la creación de una “píldora o inyección” de ejercicio. Por lo tanto, vale la pena investigar los posibles compuestos bioactivos que deberían ser el objetivo de nuevas terapias relacionadas con los miméticos del ejercicio. De hecho, algunas ideas pueden surgir en el estudio de Kurosu et al., quienes lograron atenuar la senescencia relacionada con el envejecimiento en ratones con sobreexpresión de Klotho (361). Así, el aumento de Klotho tras la realización de ejercicio físico puede demostrar un vínculo potencial entre la actividad física y el retraso del envejecimiento.

En este contexto, se podría hipotetizar que una correcta prescripción de ejercicio podría estar dirigida a obtener importantes beneficios en términos de antienvjecimiento.

Además, incluso podría generar una perspectiva para el uso de la medición de Klotho en el control biológico de programas de ejercicio y rehabilitación clínica.

Un metaanálisis publicado recientemente (456), ha evaluado el efecto combinado de diferentes protocolos de ejercicio físico en los niveles de S-Klotho poniendo de manifiesto que este aumenta consistentemente los niveles de S-Klotho en humanos, independientemente del estado de salud (sanos vs. pacientes) o el protocolo de entrenamiento implementado. Estos datos son consistentes con los obtenidos por una revisión sistemática previa (457) llevada a cabo en modelos animales y en humanos. En resumen, e integrando los resultados de los dos trabajos anteriormente mencionados, se ha demostrado que los atletas de élite presentan niveles más altos de S-Klotho en comparación con individuos sanos (458,459). Este resultado podría estar asociado con sus correspondientes elevados niveles de actividad física, mayor masa muscular, mayor capacidad de oxidación de grasas, bajo riesgo cardiometabólico y mayor fuerza muscular (460–466). Además, parece que una única sesión de ejercicio también incrementa los niveles de S-Klotho en mujeres sanas (467) y en jugadores de fútbol (467). Sin embargo, se ha sugerido que el estrés ocasionado por un operativo militar reduce los niveles de Klotho militares (467), un hallazgo que podría indicar que una condición de estrés excesivo podría disminuir la secreción de S-Klotho.

2. KLOTHO EN RESPUESTA A EJERCICIO: ¿INFLUYE EL ESTRÉS OXIDATIVO?

La exposición al estrés externo e interno desempeña un papel crucial en las moléculas secretadas en respuesta a la práctica de ejercicio (468,469). El ejercicio extenuante induce un aumento notable en los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (470). Esta condición puede implicar un incremento del daño muscular, toxinas y muerte celular (468,470,471). En contraste, es necesario un aumento transitorio en los procesos relacionados con el estrés oxidativo para disfrutar de los beneficios inducidos por el ejercicio físico (hormesis) (468,471). La hormesis es un término comúnmente utilizado para describir un efecto asociado con moléculas potencialmente tóxicas que, en dosis bajas, promueven un efecto beneficioso en el organismo expuesto y, en dosis altas, presentan un efecto deletéreo para la salud, dando lugar a una curva de respuesta óptima en forma de “U” invertida (472). En este contexto, las especies reactivas de oxígeno relativamente estables inducidas por la contracción muscular (e.g., peróxido de hidrógeno y óxido nítrico), pueden actuar como moléculas señalizadoras que mejoran la comunicación y la función celular, con el objetivo de alcanzar la estabilidad (472). Dado que S-Klotho puede regular y ser regulado por especies reactivas de oxígeno, este aumento de proteínas debería requerir un desequilibrio redox transitorio (472). Otra posible explicación del incremento de los niveles de Klotho inducidos por el ejercicio físico podría estar relacionada con el papel antiinflamatorio de este tipo de estímulo. Se sabe que los procesos inflamatorios disminuyen la expresión de Klotho, lo que conlleva un potencial proceso de envejecimiento prematuro y a patologías relacionadas con la edad (473,474). Por lo tanto, es digno de mencionar que la inflamación controlada por el

ejercicio físico puede desempeñar un papel clave en el aumento de los niveles de Klotho en humanos.

Se ha reportado que los niveles de S-Klotho parecen ser superiores en deportistas entrenados, independientemente de la carga total de entrenamiento. Sin embargo, se ha sugerido que alrededor de 150 minutos por semana parece ser el volumen óptimo para inducir cambios en S-Klotho (456). Esto podría explicarse por el aumento transitorio del estrés oxidativo, lo cual lleva a una regulación al alza del sistema antioxidante y del perfil antiinflamatorio (475–479). Dado que las intensidades de ejercicio elevadas podrían causar vasoconstricción de la arteria renal (480), la hipoxia inducida por un flujo sanguíneo limitado puede promover un estrés oxidativo transitorio que aumentaría el sistema antioxidante, incluido S-Klotho. En conjunto, podría existir un nivel de estrés óptimo para la inducción de Klotho, y estudios futuros deberían investigar la cinética de respuesta a la dosis de esta proteína después de diferentes intensidades y volúmenes. Encontrar la dosis ideal de ejercicio para optimizar la secreción de esta proteína podría implicar una mejor prescripción de protocolos dirigidos a conseguir efectos antienvjecimiento o ayudar en la elaboración de programas de entrenamiento y periodización en el deporte de alto rendimiento.

3. EL ENTRENAMIENTO FÍSICO ESTIMULA KLOTHO

Distintos protocolos de entrenamiento físico parecen estimular S-Klotho independientemente de su modalidad (e.g. entrenamiento de fuerza o aeróbico). Sin embargo, se pueden observar algunas divergencias al comparar dichos subtipos (456). Respecto a los estudios que implementaron entrenamiento de fuerza (481–483), todos incluyeron ejercicios que involucraron varios grupos musculares de tronco, tren superior e inferior. Boeselt et al. (483) programaron un total de cuatro ejercicios, Neves et al. (482) utilizaron un total de doce ejercicios, y Corrêa et al. (481) implementaron ocho ejercicios. El estudio de Boeselt et al. no presentó un efecto significativo sobre S-Klotho en respuesta a la intervención, consistiendo dicho protocolo en 15–20 series de 2–4 repeticiones (481). Aunque su carga de entrenamiento total fue similar a la de los otros estudios incluidos, se sabe que diferentes metodologías de entrenamiento (e.g., número de series o repeticiones) producen respuestas metabólicas distintas en los humanos (481). Específicamente, el tiempo bajo tensión es una variable que puede influir en las respuestas inducidas por el entrenamiento de fuerza (484,485). Burd et al. demostraron que un mayor tiempo bajo tensión muscular aumenta la síntesis de proteínas mitocondriales y sarcoplásmicas (484). Dado que Klotho está influenciado principalmente por aspectos metabólicos (384,437,444), es plausible pensar que diferentes tipos de prescripción de ejercicio de fuerza originen respuestas diferentes en términos de S-Klotho.

En cuanto a los estudios que implementaron entrenamiento aeróbico, dos estudios utilizaron un tapiz rodante para la intervención (486,487), uno utilizó un cicloergómetro (488), y otro realizó entrenamiento acuático aeróbico (457). En términos fisiológicos, estas intervenciones presentan importantes diferencias que deberían considerarse para realizar una correcta interpretación (489,490). Sin embargo, todos ellos obtuvieron

respuestas similares en la síntesis y secreción de S-Klotho. Estos hallazgos podrían explicarse debido al impacto integral del ejercicio aeróbico en la biogénesis mitocondrial (491). Como se ha mencionado anteriormente, el metabolismo oxidativo parece influir importantemente en la producción de Klotho. Por lo tanto, el entrenamiento aeróbico probablemente induce un incremento en S-Klotho independientemente de la configuración del protocolo, debido al estímulo general a nivel mitocondrial.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, una combinación de entrenamiento de fuerza y aeróbico (entrenamiento concurrente) parece ser el protocolo óptimo para aumentar S-Klotho en humanos.

4. KLOTHO COMO MIMÉTICO DEL EJERCICIO FÍSICO

Es importante destacar que un mimético del ejercicio probablemente no sea la mejor intervención términos de salud, no resolviendo el problema de la falta de actividad física y sedentarismo (491). No obstante, el papel potencial de una “píldora de ejercicio” sería tratar de mimetizar los beneficios y bondades del ejercicio físico en poblaciones que no pudieran realizar actividad física por algún motivo en concreto (456).

En el estudio de seguimiento a 30 años “*Dallas bedrest study*” (492), se observó que 3 semanas de reposo en cama en hombres de 20 años tenía un mayor impacto en parámetros cardiovasculares que 30 años de envejecimiento fisiológico. Teniendo en cuenta que una persona con lesión medular, coma o tras una cirugía, puede pasar hasta 3 semanas de reposo en cama, podríamos plantear una pregunta clave: ¿pueden los miméticos del ejercicio mitigar los impactos causados por estas condiciones? En este contexto, Klotho parecer ser una exerquina emergente inducida por diferentes protocolos de entrenamiento físico. Futuras investigaciones son necesarias para valorar si esta proteína antienvjecimiento podría utilizarse como un compuesto bioactivo que actuara como mimético del ejercicio.

5. KLOTHO COMO OBJETIVO EN CIENCIAS DEL DEPORTE Y MEDICINA

La prevención y rehabilitación de diversas lesiones deportivas ha sido ampliamente estudiada a lo largo de la historia (493–496). Parámetros concretos como la fuerza muscular, la composición corporal y los niveles de condición física en general pueden influir en la predicción de lesiones (494). Estas propiedades parecen estar constantemente moduladas por diversas vías moleculares, entre las cuales podríamos encontrar a Klotho (497–499). En roedores, una reducción en esta proteína implicó una pérdida de función en células madre musculares (497). Asimismo, Klotho también parece modular la miogénesis acelerando el crecimiento muscular después de una lesión (499). Además, una disminución en la expresión de Klotho parece contribuir a un daño incrementado en el cartílago de ratones con osteoartritis (498). En conjunto, toda esta evidencia apunta a un posible papel de Klotho en el manejo de lesiones musculares y cartilagosas.

Aunque la mayoría de los estudios mencionados previamente han demostrado que el entrenamiento físico crónico aumenta los niveles de S-Klotho en humanos, ninguno de ellos ha descrito un efecto causal entre Klotho y los resultados beneficiosos inducidos por el ejercicio (e.g., rendimiento físico o composición corporal). Sin embargo, Phelps et al. pusieron de manifiesto que la expresión de Klotho es necesaria para permitir que el ejercicio tenga un efecto positivo sobre la capacidad aeróbica y la fuerza muscular (498). Sahu et al. verificaron que la supresión del gen Klotho *in vivo* parece obstaculizar la progresión de la línea celular de las células progenitoras musculares, disminuyendo la regeneración de las fibras musculares (498). Esta supresión génica también provocó daño en el ADN mitocondrial y afectó a la bioenergética celular. Por lo tanto, S-Klotho podría servir como un posible biomarcador del estado de entrenamiento y debería ser objetivo

de futuros estudios, con el objetivo de verificar la causalidad entre Klotho y los beneficios inducidos por el ejercicio físico en humanos.

En resumen, los resultados generales de los estudios abordados en esta sección respaldan la idea de que Klotho podría ser una exerquina asociada a multitud de beneficios en términos de salud y rendimiento. Sin embargo, no hay consenso sobre el protocolo de ejercicio ideal para lograr un mayor aumento en las concentraciones de Klotho. Además, especulamos que su síntesis y secreción podría ser dependiente del volumen, la intensidad y la duración del entrenamiento. Anticipamos que Klotho tiene potencial en un contexto industrial y científico en relación al desarrollo de una herramienta biotecnológica mimética del ejercicio.

IV. TEORÍA DE LOS VALORES DE REFERENCIA

1. ORIGEN DE LOS VALORES DE REFERENCIA

La noción de “valores de referencia” (VR) tiene sus raíces en las primeras prácticas médicas y de laboratorio, donde los médicos observaron patrones en las distintas medidas biológicas y definieron rangos considerados normales a lo largo de la historia (500). La evolución hacia la definición actual de VR ha sido impulsada por los avances en medicina y estadística, resultando en enfoques más precisos y basados en la evidencia.

El concepto de normalidad en medicina se remonta a la antigua Grecia, donde Hipócrates, considerado el padre de la medicina, abordó la idea de equilibrio y armonía en el cuerpo como indicadores de salud (501). Sin embargo, no fue hasta el siglo XIX cuando Claude Bernard introdujo el concepto de “homeostasia” como constancia del medio interior, postulando que el cuerpo busca mantener un equilibrio interno y cualquier desviación podría indicar un estado patológico (502). Francis Galton desempeñó un papel esencial en la conceptualización de la variabilidad biológica y su influencia en los VR (503). A finales del siglo XIX, introdujo el concepto de “regresión hacia la media”, fundamental para entender la herencia y la variabilidad, y sentó las bases para la aplicación de métodos estadísticos en la determinación de VR en medicina y en el laboratorio clínico. Karl Pearson, otro destacado estadístico de la misma época, continuó el legado de Galton y contribuyó al desarrollo de la teoría estadística aplicada a la biología (504). A través de sus estudios sobre correlación y distribuciones estadísticas, proporcionó herramientas adicionales para cuantificar la variabilidad y establecer intervalos de referencia más precisos. Ronald A. Fisher (discípulo de Pearson) continuó con el desarrollo de estas ideas en el siglo XX, proponiendo métodos estadísticos aún más robustos y aplicándolos a la genética y la epidemiología. De hecho, introdujo conceptos

clave como la varianza y la inferencia estadística, consolidando la base teórica necesaria para la determinación precisa de VR en investigaciones biomédicas (505).

No es hasta 1969 cuando Gräsbeck y Saris promueven una transformación fundamental en la terminología y el enfoque utilizado en la medicina de laboratorio, sustituyendo el concepto “valores normales”, tan comúnmente utilizado para describir los rangos considerados típicos en diversas medidas biológicas, por VR (fluctuaciones de las concentraciones de analitos en sangre en grupos de individuos bien caracterizados) (506). Con su publicación, los autores pretendían abordar las limitaciones inherentes al término “valores normales” y lograr una comprensión más integral y estadística de la variabilidad biológica en una población sana. Este cambio marcó un alejamiento de la percepción de la salud como una categoría binaria y permitió tener en cuenta la variabilidad intra e interindividual, conceptos que ya habían desarrollado Bernard y Galton en sus obras.

Los métodos paramétricos para el cálculo de los valores de normalidad empleados hasta esa fecha utilizaron la media y la desviación estándar para establecer intervalos basados en la distribución normal de la población. Sin embargo, estos métodos presentaban limitaciones al asumir una distribución normal de los datos. Así, Reed en 1971 propuso el método no paramétrico de los percentiles para el cálculo más preciso de los VR, permitiendo una mayor flexibilidad y adaptabilidad a la variabilidad intrínseca de diferentes pruebas clínicas y poblaciones (507). En él, se ordenan los datos de menor a mayor y se eligen los percentiles 2,5 y 97,5, obteniéndose los límites inferior y superior para el intervalo de referencia que abarca el 95% de la población.

2. CONCEPTO ACTUAL DE LOS VALORES DE REFERENCIA

El concepto de valor de referencia publicado el año 1969 y las guías posteriores fueron aceptadas por la comunidad científica y también por los organismos públicos como “el

conjunto de valores de una magnitud biológica determinados con un procedimiento de medida específico en su totalidad, y obtenidos en un solo individuo o en una población de referencia, que cumplen unos criterios definidos”.

Las primeras recomendaciones oficiales sobre la teoría y establecimiento de los VR fueron publicadas en 6 partes por la Federación Internacional de Química Clínica (“*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*” [IFCC]) en 1978 (508) a través de su panel de expertos, entre los que se encontraba Gräsbeck. En base a estas recomendaciones internacionales, otras sociedades científicas publicaron las suyas propias, como la actual Sociedad Española de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (SEQC^{ML}) (509). El Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (“*Clinical and Laboratory Standards Institute*” [CLSI]), organización sin ánimo de lucro fundada en 1968 y cuyo fin es desarrollar estándares de laboratorio aplicables a nivel mundial, publicó en 2010 una guía (“*EP28-A3C: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory*”) basada en las recomendaciones originales de la IFCC (510). Este documento, vigente en la actualidad en su tercera edición, es utilizado ampliamente por los laboratorios clínicos para obtener los VR mediante lo que conocemos como el método directo. El establecimiento de los VR es un proceso complejo que debe ser uniforme, sistemático y validado por agencias altamente capacitadas. En ese sentido, conviene establecer los conceptos, principios y los procedimientos para la determinación y uso de los VR desarrollados por el panel de expertos de la IFCC y el CLSI.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN DE LOS VALORES DE REFERENCIA

La ciencia del laboratorio clínico es, sin duda, la más objetiva y exacta de las disciplinas clínicas (511). Al ser competencia del laboratorio clínico la producción e interpretación de valores analíticos, le corresponde el establecimiento de VR en función de la población a la que presta sus servicios y de los sistemas de medida que utiliza. Los componentes químicos del organismo humano están sujetos a variaciones provocadas por procesos fisiológicos, diferencias genéticas, enfermedades y factores ambientales. Es, por tanto, una tarea fundamental del laboratorio clínico proporcionar conjuntos relevantes de datos de referencia que sean confiables, comparables e intercambiables entre laboratorios (508).

El estudio de los VR puede realizarse en varias circunstancias:

- Para verificar o comprobar los VR ya transferidos o adoptados en el laboratorio.
- Para introducir un procedimiento de medida nuevo con características metrológicas o diagnósticas distintas.
- Para instaurar una nueva magnitud en la población.

4. DEFINICIONES Y CONCEPTOS

En el marco de la teoría de los VR es primordial establecer una serie de conceptos y definiciones generales que permitan establecer una base sólida y precisa en el ámbito de la medicina de laboratorio. En última instancia, esto genera coherencia y fiabilidad en la aplicación práctica de los VR por los distintos laboratorios, contribuyendo a la estandarización de procedimientos y a la comparabilidad de resultados entre diferentes laboratorios y poblaciones (512). El empleo de una nomenclatura estándar permite una comunicación efectiva y garantiza una interpretación uniforme de los hallazgos de laboratorio. Es por ello que las principales sociedades científicas, entre las que destacan el CLSI y la IFCC, han promovido una nomenclatura común para hacer frente a los desafíos metrológicos en la medicina de laboratorio (508,510).

4.1. Individuo de referencia

El concepto de VR parte de la definición del término individuo de referencia. Un individuo de referencia es una persona seleccionada para la prueba sobre la base de criterios bien definidos y que pertenece a la comunidad a la que sirve el laboratorio en cuestión. Generalmente, los individuos de referencia se caracterizan por disfrutar de un estado de salud definido por el propio investigador, no un estado de salud absoluto. Por lo tanto, los individuos de referencia deben seleccionarse previamente bajo unos criterios de inclusión y exclusión cuya definición debe ser precisa según los objetivos del estudio, pudiendo diferir de uno a otro. Así, los VR obtenidos a partir de los individuos seleccionados según los criterios dados serán aplicables sólo a individuos con características similares.

4.2. Población de referencia

Una población de referencia queda constituida por todos aquellos posibles individuos de referencia que cumplen las condiciones de inclusión definidas por el investigador. Dado que el número de individuos que integra la población de referencia suele ser muy alto, se recurre a la teoría estadística del muestreo y se emplea una muestra de referencia más abarcable.

4.3. Muestra de referencia

Corresponde a un grupo representativo de la población de referencia sobre el que se realizaran las determinaciones analíticas y sobre la cual se inferirá el valor de los parámetros de toda la población. Esta simplificación puede llevar a determinados errores a la hora de seleccionar los individuos y que estos no sean representativos de la población, lo cual se minimiza aumentando el tamaño de la muestra.

4.4. Valores de referencia

CLSI/IFCC definen el valor de referencia como el resultado de la prueba obtenido por la observación o medición de un tipo particular de cantidad en un individuo de referencia, siendo los VR aquellos que se obtienen de una muestra de referencia.

4.5. Distribución de referencia

Corresponde a la distribución de los datos recogidos en la muestra de referencia. Esta distribución puede o no seguir un modelo gaussiano, también conocido como distribución normal (i.e., distribución estadística simétrica donde la mayoría de los datos se concentran alrededor de la media y el resto se despliega de manera predecible hacia los extremos) (513), por lo que el tipo de distribución de los datos, o su desconocimiento, condicionan el tratamiento estadístico de los mismos.

4.6. Límites de referencia

Los límites de referencia son los valores máximo y mínimo derivados de la distribución de referencia y que tienen carácter descriptivo.

4.7. Intervalo de referencia

Es el intervalo entre dos límites de referencia (ambos incluidos). Este comprende sólo una fracción de los valores medidos en la muestra de referencia, siendo lo más frecuente el 95% de la distribución de referencia y dejando fuera los valores inferiores al 2,5% y superiores al 97,5%. En consecuencia, en el 5% de los individuos sanos se observarán valores fuera de los límites de referencia. El 95% se ha convertido en una convención estándar en la estadística y en la construcción de intervalos de confianza, ya que abarca la gran mayoría de los datos en una distribución normal y proporciona un intervalo suficientemente amplio para ser representativo, pero lo suficientemente estrecho para no incidir en error y resultar de utilidad en la práctica clínica (514).

La relación entre estos términos relacionados se muestra en la **Figura 5**, extraída y traducida de la guía original de la IFCC de 1978. Puesto que el valor observado en un individuo se puede comparar tanto con los VR como con el intervalo de referencia (así como con la distribución y los límites de referencia), estos conceptos son, en la práctica, intercambiables, ya que vienen a definir diferentes formas de representar dicho concepto.

El concepto actual de “intervalo de referencia” se aleja del introducido hace más de 30 años para diferenciarlo del de “valores normales” debido a la dificultad de atribuir a un sujeto la condición de “normal”. Por el modo de calcular el intervalo de referencia, un 5% de los individuos “sanos” quedan excluidos del intervalo. Así, el intervalo de referencia se refiere a un grupo de personas que presentan características comunes y coinciden con los criterios iniciales de inclusión en grupos biológicamente homogéneos.

Los más comunes suelen ser la edad, el sexo, la etnia, la zona geográfica, el ayuno, la dieta, el ejercicio, el tabaquismo, el embarazo o la ausencia (o presencia) de ciertas patologías, entre otros. Por este motivo, cada laboratorio debe calcular sus propios límites para cada magnitud siguiendo las recomendaciones de los paneles de expertos de la IFCC y el CLSI.

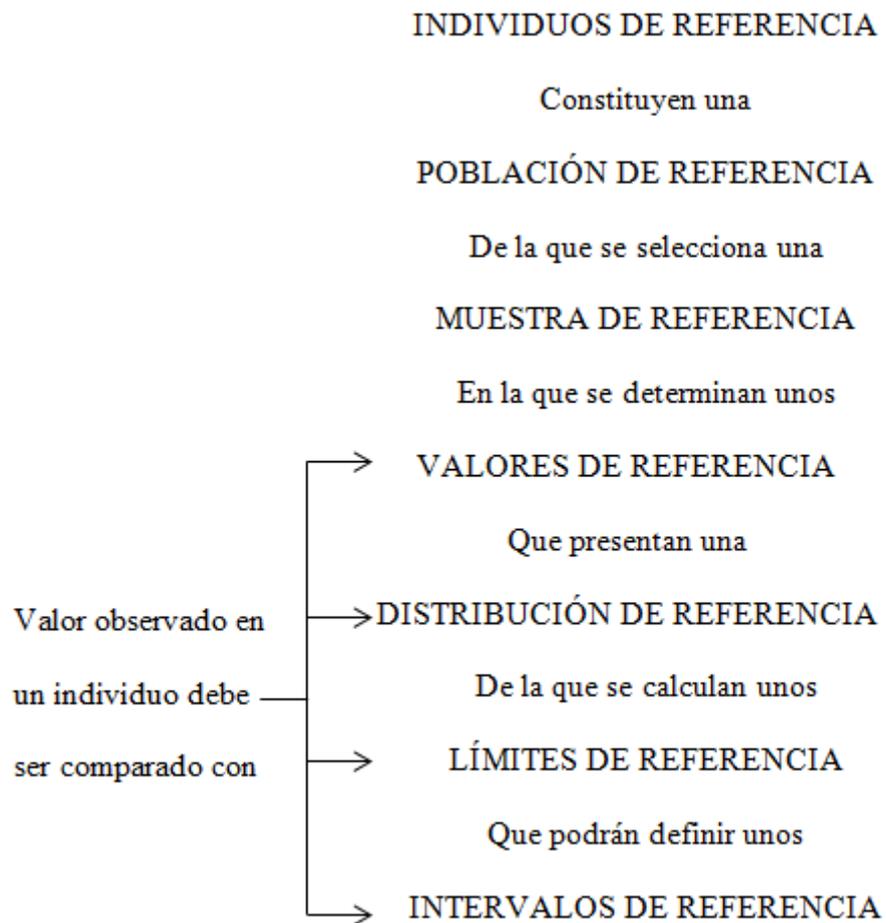


Figura 5. Esquema de la relación entre los conceptos de la teoría de los valores de referencia. Figura tomada y traducida de (508).

5. ESTABLECIMIENTO DE LOS VALORES DE REFERENCIA.

MÉTODO DIRECTO

Se ha avanzado mucho en metrología y medicina de laboratorio desde la publicación de las primeras recomendaciones de la IFCC en 1979 en materia de VR. Diferentes sociedades científicas nacionales e internacionales han colaborado en la elaboración de guías de práctica clínica para facilitar a los laboratorios la compleja labor de producir sus propios intervalos de referencia. La más ampliamente aceptada por la comunidad científica y más empleada en los laboratorios es la actualización de 2010 de la guía del CLSI “C28-A3c: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory” (510).

Esta guía describe los procesos secuenciales que se deben llevar a cabo para transferir los VR (i.e., adaptar un intervalo de referencia previamente establecido a un nuevo método analítico o a una nueva ubicación), verificar los VR (i.e., garantizar, con un margen razonable de confianza y utilizando un número relativamente pequeño de individuos de referencia, que un intervalo de referencia establecido o transferido en otro lugar puede ser usado en la nueva ubicación) o establecer los VR (i.e., creación *de novo* de un intervalo de referencia desde la selección de los individuos de referencia hasta la recopilación y análisis de los datos obtenidos).

El establecimiento de los VR debe realizarse cuando se implementa un nuevo analito o una nueva determinación o método del mismo en el laboratorio, así como cuando se emplea para un grupo diferente de individuos que difiere del original con el fin de comparar los valores observados con una población definida de sujetos de similares características y así poder proceder en la toma de decisiones sobre el significado del valor observado. La guía EP28-A3c del CLSI, recomienda un protocolo de 13 pasos para poder

establecer los VR de forma robusta y exacta, que de manera resumida se pueden agrupar en 4 procedimientos clave que se describen a continuación.

5.1. Establecer una lista de interferencias analíticas y fuentes de variabilidad biológica

Las interferencias analíticas se definen como el efecto de una sustancia presente en la muestra que altera el valor correcto del resultado para un analito y se clasifican en dos tipos: endógenas (e.g., hemólisis, lipemia, hiperbilirrubinemia o paraproteinemia, entre otras) y exógena (e.g., fármacos o contrastes yodados) (515).

La variabilidad biológica (VB) son las fluctuaciones que presentan la mayoría de los analitos en el tiempo, la cuales pueden mostrar un ritmo cíclico diario, mensual o estacional o simplemente cambios aleatorios (515). Las principales fuentes de VB son las determinadas genéticamente y las condiciones ambientales. La VB se expresa en términos de coeficiente de variación (CV) y tiene dos componentes: (i) la VB intraindividual (CV_I), esto es, la fluctuación media de un analito alrededor del punto homeostático en un individuo, y (ii) la VB interindividual (CV_G), es decir, las diferencias entre los puntos homeostáticos de un analito de diferentes individuos (516,517). La VB tiene múltiples aplicaciones en diversos campos del laboratorio clínico, como el control interno del proceso analítico, los programas de garantía externa de la calidad, la verificación y validación de métodos analíticos, la realización de estudios de interferencias, o el establecimiento del límite de cuantificación de un mensurando, entre otros (518).

Tanto la obtención de la lista de posibles interferentes analíticos como la reducción de las posibles fuentes de VB deben ser tenidas en cuenta a la hora de establecer los VR para evitar o disminuir los sesgos. Realizar estudios propios puede resultar complejo, tanto metodológicamente como por la elevación de los costos y el tiempo de estudio. Por este

motivo el CLSI recomienda utilizar la literatura científica como base para armonizar todos los procedimientos llevados a cabo tanto en fase analítica como preanalítica en el establecimiento de los VR.

5.2. Selección de los individuos de referencia

Si los individuos que constituyen una población de referencia están bien definidos y categorizados, la muestra de referencia empleada debe ser suficientemente representativa de dicha población y podrán realizarse inferencias estadísticas a partir de los resultados obtenidos (consultar apartado 4 de la Introducción).

La salud es una condición relativa que carece de una definición universal, por lo que el primer paso a la hora de escoger a los individuos de referencia es determinar los criterios de exclusión de aquello que se considera “no saludable”. La designación de buena salud para un individuo de referencia candidato puede implicar una variedad de exámenes, tales como antecedentes personales y familiares, pruebas físicas y/o ciertas pruebas de laboratorio clínico, así como un cuestionario de salud.

Aunque el estado de salud es subjetivo y depende en alto grado de los objetivos del estudio, el CLSI propone algunos motivos de exclusión generales en los estudios de los VR que se muestran en la **Tabla 1**. Por otro lado, los criterios de inclusión o partición son características del individuo de referencia que dividen la muestra de referencia en subclases significativas. Dos de los criterios de partición más comunes son la edad y el sexo, pero existen otros reflejados en la **Tabla 1**.

Algunas de estas recomendaciones pueden resultar vagas o inexactas, pero cabe recordar que se basaron en las que estableció el Comité Escandinavo de Valores de Referencia en 1975 (519). En estas recomendaciones, se consideran condiciones patológicas la insuficiencia renal, la insuficiencia cardíaca congestiva, las enfermedades

respiratorias crónicas, las patologías hepáticas, los síndromes de malabsorción y las anemias.

Tabla 1. Ejemplos de posibles criterios de exclusión y de inclusión. Tabla tomada y traducida de la guía EP28-A3c del CLSI (510).

Criterios de exclusión	
Consumo de alcohol	Enfermedad reciente
Donación de sangre reciente	Lactancia
Hipertensión arterial	Obesidad
Abuso de drogas	Ocupación laboral
Fármacos	Anticonceptivos orales
Embarazo activo	Cirugía reciente
Ayuno	Tabaquismo activo
Factores genéticos	Transfusión reciente
Hospitalización actual o reciente	Abuso vitamínico
Criterios de inclusión	
Edad	Ubicación geográfica
Grupo sanguíneo	Postura cuando muestreado
Variación circadiana	Sexo
Dieta	Ejercicio
Etnia	Raza
Antecedentes de embarazo	Antecedentes de tabaquismo
Ayuno o no	Ciclo menstrual

En cuanto a la toma de sustancias, se debe excluir a los individuos que se encuentran tanto con tratamientos farmacológicos para enfermedades como con terapias de suplemento o reemplazo, a los consumidores de drogas (incluido el tabaco) y a aquellos con una ingesta excesiva de alcohol o que lo consumieran en las 24 horas previas al análisis. Ciertos estados fisiológicos como el embarazo o individuos con altos niveles de

actividad física deben excluirse, así como aquellos con patologías mentales o psicológicas como el estrés o la depresión.

En individuos de mayor edad, la aplicación estricta de estas recomendaciones se ve dificultada por el propio proceso de envejecimiento, ya que éste conlleva la aparición de patologías relacionadas con el mismo y, en muchas ocasiones, medicación crónica o polimedicación. Por este motivo, suele emplearse una mayor proporción (al menos el 80%) de individuos con edades comprendidas entre los 18 y los 65 años, además de igualdad de sexo y distribución por edades. Para aquellos de más edad, se requiere una aproximación más pragmática, entendiendo salud como la ausencia de signos de enfermedad o condiciones que se puedan relacionar específicamente con los analitos a medir.

Existen dos formas de muestreo o selección de los individuos de referencia. El CLSI recomienda realizar la técnica de selección directa (método directo), en la que los datos son recogidos con la expresa finalidad de determinar los intervalos de referencia, existiendo un control sobre la forma en que se realiza la determinación y la información que se recoge de los sujetos. A su vez, la técnica directa se subdivide en selección *a priori* y *a posteriori*. En la primera, los individuos se seleccionan de una población de referencia utilizando criterios específicos y bien definidos de inclusión/exclusión antes de realizar el análisis (y la extracción de sangre). A través del cuestionario de salud y la exploración, se seleccionan los individuos y se clasifican en subgrupos. Cuando la selección de los individuos se hace *a priori*, junto con el cuestionario de salud se suele entregar el consentimiento informado. Es apropiado que el laboratorio obtenga el consentimiento informado por escrito de cada individuo de referencia en el que se confirma la comprensión y aceptación libre y voluntaria de participar en el estudio conociendo los

riesgos, beneficios, consecuencias o problemas que se puedan presentar durante el desarrollo del mismo (520).

En la técnica de muestreo directa *a posteriori*, los criterios de inclusión/exclusión se suelen aplicar después de la extracción de sangre y la determinación del analito. Así, se recoge un número importante de individuos y, en función de los resultados, se les selecciona para formar parte de la población de referencia y se decide la necesidad o conveniencia de estratificarlos. Este método es especialmente útil para procedimientos de laboratorio que son nuevos o poco estudiados y para los cuales la literatura contiene poca información.

Mediante la técnica de muestreo indirecto, los intervalos de referencia se establecen gracias a los valores de laboratorio almacenados en bases de datos obtenidas con otros fines. La técnica indirecta de selección de individuos se suele llevar a cabo ante la dificultad de recolectar muestras de sujetos sanos (e.g., muestras pediátricas). En este caso, los individuos de referencia suelen ser donantes de sangre o pacientes que se han sometido a un examen periódico de salud, a una cirugía menor ambulatoria o a un estudio genético de segregación familiar.

5.3. Condiciones preanalíticas y analíticas

Los resultados analíticos de las poblaciones de referencia deben reflejar todas las variables preanalíticas y analíticas que puedan influir en los resultados de las pruebas. Deben definirse apropiadamente, por tanto, todos los factores preanalíticos tales como la preparación del sujeto, la recolección de la muestra y el procesamiento, el método analítico y la instrumentación.

Los factores preanalíticos involucran dos áreas, la biológica (i.e., factores que son de origen metabólico y hemodinámico como el entrenamiento físico o la técnica de punción

venosa) y la metodológica (i.e., factores relacionados con la recolección, manipulación y almacenamiento de las muestras).

Además de la VB intra e interindividual, los intervalos de referencia también se ven influenciados por la variabilidad analítica del método de medida utilizado. Por ello, el CLSI recomienda utilizar medidas de control interno de la calidad analítica e informar de la imprecisión analítica entre series, el límite de detección, la linealidad, la recuperación y las interferencias, así como el equipo o equipos, los reactivos, la calibración y el método de cálculo.

La descripción detallada de cada factor sirve para estandarizar el procedimiento y así evitar la inexactitud en los resultados analíticos o sesgos, para la correcta comparación de métodos o instrumentos, la reproducibilidad y para el proceso de toma de decisiones.

5.4. Análisis de los valores de referencia: método directo *a priori*

Siguiendo las recomendaciones del CLSI/IFCC (510), para el establecimiento de VR por el método directo *a priori* es necesario, por un lado, disponer de un procedimiento de medida de calidad suficiente y de un método de obtención, manipulación y almacenamiento de las muestras estandarizado para disminuir al máximo la variabilidad preanalítica y analítica. Por otro lado, se debe definir la población de referencia de forma inequívoca, especificando los criterios de exclusión e inclusión, y se deben formar grupos homogéneos iniciales en base a ellos, lo cual permitirá controlar en la medida de lo posible la variabilidad biológica.

Una vez realizadas las determinaciones en el laboratorio, el CLSI/IFCC recomienda seguir un protocolo secuencial en el análisis estadístico de los VR (**Figura 6**).

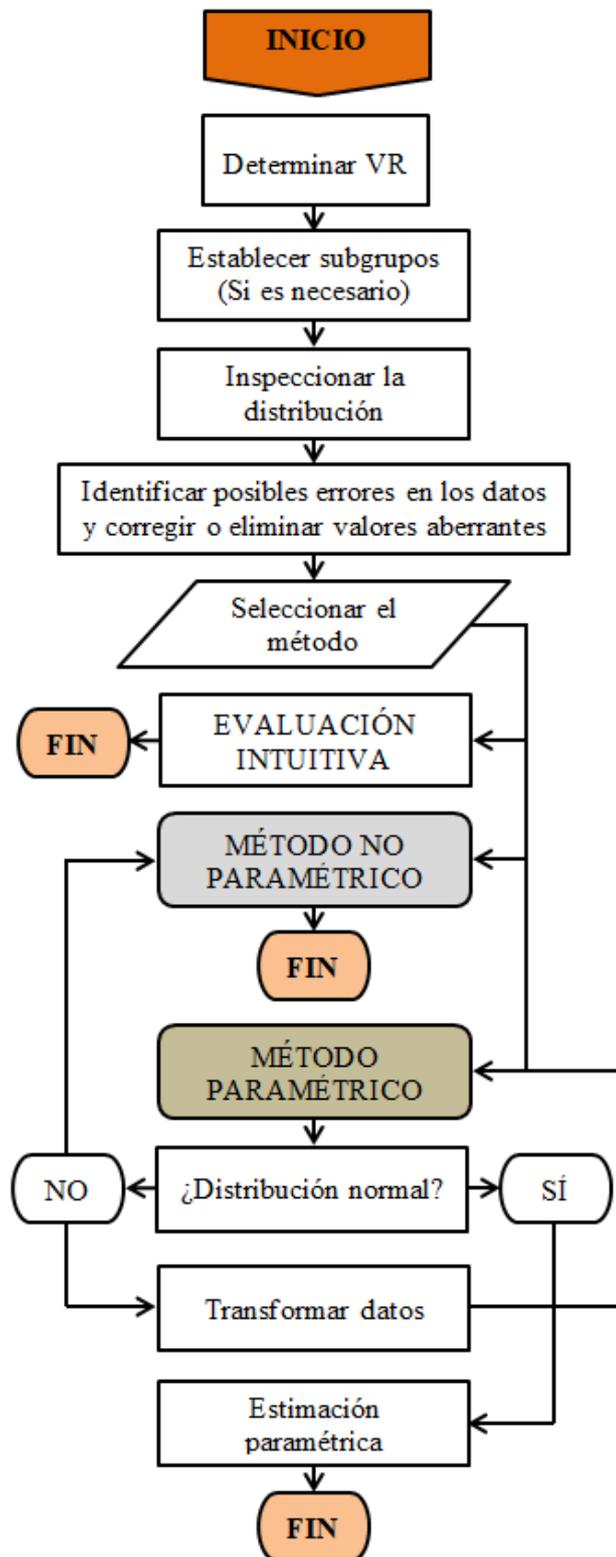


Figura 6. Diagrama de flujo que muestra el procedimiento para estimar los límites de referencia. Extraída y traducida de (521).

Una vez obtenidos los VR, se deben inspeccionar los datos, organizarlos en subgrupos (generalmente de edad y sexo), representarlos en un histograma con ayuda de las múltiples herramientas computacionales disponibles, identificar posibles errores y valores atípicos o aberrantes y determinar los límites de referencia y sus intervalos de confianza (IC) en función de la n (tamaño de la muestra).

Se debe considerar la división de los VR en subgrupos si, en base a la bibliografía, los posibles factores de variación de la magnitud biológica a determinar son suficientemente importantes como para dar lugar a estratificaciones. El IFCC/CLSI recomienda el empleo del método estadístico de Harris y Boyd de comparación entre dos subgrupos para determinar si dicha estratificación es relevante (522). La subdivisión de los VR da como resultado una menor variación intragrupo y, por tanto, intervalos de referencia más estrechos y sensibles.

Los valores atípicos son aquellos que se alejan de la distribución de referencia y no pertenecen a ella, por lo que su detección y posterior eliminación resultan fundamentales. Suelen ser debidos a errores preanalíticos o analíticos. Además del examen visual del histograma, las pruebas de valores atípicos más utilizadas por su simplicidad y recomendadas por el IFCC/CLSI independientemente del método estadístico empleado para establecer los intervalos de referencia son la de Dixon-Reed (523), que sólo se puede utilizar cuando se sospecha un valor atípico, y la de Tukey (524), cuando se sospechan múltiples valores atípicos.

En la literatura se han propuesto varios tipos de intervalos de referencia: intervalo interfractil, intervalo de tolerancia e intervalo de predicción (525). Los intervalos de referencia definidos por fractiles son el tipo más utilizado y se estiman fácilmente tanto de forma paramétrica como mediante métodos estadísticos no paramétricos. Estos intervalos de referencia contienen por convención la fracción central de 0,95 (95%) de la

distribución de referencia. Por tanto, los límites de referencia pueden estimarse como los fractiles 0,025 (α) y 0,975 ($1-\alpha$) y deben ir acompañados de intervalos de confianza, generalmente, y por recomendación del IFCC/CLSI, del 90% alrededor de cada límite de referencia (**Figura 7**).

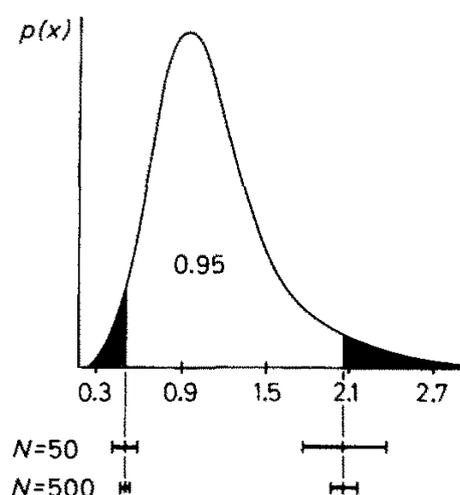


Figura 7. Intervalo de referencia de 0,95 y efecto del tamaño de la muestra. La figura muestra la distribución de los valores de concentración de S-triglicéridos. Abscisa: (concentración de S-triglicéridos)/(mmol/L). Ordenada: densidad de probabilidad. Los fractiles 0,025 y 0,975 son 0,5L y 2,05 mmol/L, respectivamente. Los intervalos de confianza de 0,90 se muestran debajo de la abscisa para dos tamaños de muestra: 50 y 500 VR. Figura extraída y traducida de (521).

Para el establecimiento de los límites de referencia mediante fractiles, el CLSI/IFCC describe distintos métodos estadísticos dependiendo de si la distribución de los VR, o su transformación matemática, siguen una distribución normal (ley de Laplace-Gauss), el denominado método paramétrico, o no la siguen o se desconoce, método no paramétrico. Sin embargo, el CLSI/IFCC recomienda el método no paramétrico de manera general debido a su simplicidad y que el tipo de distribución normalmente no se conoce *a priori*.

El método no paramétrico puede realizarse automáticamente mediante un software de cálculo o estimarse manualmente de manera sencilla. Manualmente, consiste en ordenar

en valores numéricos crecientes los n VR y, posteriormente, calcular el número de rango del fractil 0,025 como 0,025 ($n+1$) y el fractil 0,975 como 0,975 ($n+1$). El límite inferior de referencia será igual al valor de referencia correspondiente al número de rango del fractil 0,025 y de igual manera el límite superior de referencia al fractil 0,975.

Ahora bien, los fractiles α y $1-\alpha$ no son estimables a menos que α sea igual o mayor que $1/n$. Si $n \geq 1/\alpha \rightarrow n \geq 1/0.025 \rightarrow n \geq 40$. Esto supone que para el cálculo de los límites de referencia por el método de los fractiles, el tamaño muestral mínimo debe ser de 40. Sin embargo, Reed se percató que para calcular también los IC del 90% de forma no paramétrica para cada límite de referencia se debían obtener un mínimo de 120 VR, uno de cada sujeto de estudio, una vez eliminados los valores atípicos y para cada subgrupo.

El IC es el rango de valores que incluye el verdadero percentil (por ejemplo, el percentil 2,5 de la población) con una probabilidad específica, generalmente 90%. El cálculo del IC es útil para evaluar la variabilidad de la muestra para el percentil que se estima. El IC decrece cuanto mayor es la n y, por tanto, mejor es la estimación del intervalo de referencia. Así, para estimar los límites de referencia con un IC del 95%, son necesarios un mínimo de 146 VR, mientras que para un IC del 99%, se necesitan un mínimo de 210 VR.

Resumiendo, para la obtención de los VR se debe medir la magnitud en muestras de individuos sanos representativos de la población objeto de estudio. Tras la eliminación de los valores atípicos y la división por subgrupos, se elabora el intervalo de referencia que contiene por convenio el 95% de los valores observados. Los límites de referencia se obtienen a través de una representación gráfica y de cálculos matemáticos o bien directamente mediante un programa informático. Cuando los VR se ajustan a una distribución normal, con 40 muestras es suficiente. Sin embargo, el IFCC/CLSI recomienda llevar a cabo un análisis estadístico de los resultados utilizando métodos no

paramétricos (los cuales no requieren ninguna hipótesis en cuanto a la distribución de frecuencias) y aconsejan un mínimo de 120 muestras para cada subgrupo (una vez eliminados los valores atípicos) para un intervalo de confianza al 90% (n=146 para un IC=95% y n=210 para un IC=99%).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

I. HIPÓTESIS GENERAL

La hipótesis general de la presente Tesis Doctoral es que los niveles de S-Klotho se verían afectados por la edad y el sexo en individuos sanos del sur de España y que un programa de ejercicio físico supervisado de 24 semanas puede optimizar los niveles de S-Klotho en adultos jóvenes sanos.

II. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la Tesis Doctoral es establecer los VR de los niveles séricos de S-Klotho en adultos sanos de 18 a 85 años e investigar los efectos de un programa de ejercicio supervisado de 24 semanas sobre los niveles S-Klotho en adultos jóvenes sanos.

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. ESTUDIO I

El estudio I tuvo por objetivo establecer los VR de los niveles séricos de S-Klotho utilizando un kit ELISA en adultos sanos de 18 a 85 años.

2. ESTUDIO II

El estudio II tuvo por objetivo investigar los efectos dosis-respuesta de un programa de ejercicio supervisado de 24 semanas sobre los niveles S-Klotho en adultos jóvenes sanos.

METODOLOGÍA

Tabla 2: Información metodológica general de los estudios incluidos en la Tesis Doctoral.

	Estudio I	Estudio II
Diseño	Transversal - Analítico	Ensayo controlado aleatorizado de 3 brazos
Características de los participantes	Adultos sanos N=346 (203 mujeres, 18-85 años)	Adultos jóvenes sanos N=110 (75 mujeres, 22 ± 2 años)
Variable independiente	N/A	Programa de ejercicio supervisado de 24 semanas
Variable Dependiente	Niveles de S-Klotho	Niveles de S-Klotho
Análisis estadístico	Análisis de la varianza (ANOVA) de 1 vía	ANOVA de medidas repetidas / Análisis de la covarianza

I. ESTUDIO I

En este estudio transversal analítico participaron 346 voluntarios sanos (143 hombres) de 18 a 85 años, seleccionados según criterios de inclusión específicos (**Tabla 2**). Se siguieron las pautas éticas de la Declaración de Helsinki y se obtuvieron muestras sanguíneas entre 2017 y 2020 del Biobanco del Sistema Público de Salud de Andalucía. Las muestras fueron procesadas según un protocolo estándar y los niveles de S-Klotho se determinaron mediante un ensayo ELISA. El método incluyó la recolección de muestras de sangre en condiciones específicas, seguida de la medición cuantitativa de S-Klotho mediante espectrofotometría. Los resultados se analizaron en base a los coeficientes de variación intra e interensayo, y se aseguró la calidad metodológica mediante la inclusión de muestras control. Este enfoque trata de establecer VR para el biomarcador S-Klotho en una población adulta sana, contribuyendo así al entendimiento de su relevancia clínica y fisiológica.

II. ESTUDIO II

En este estudio participaron un total de 144 adultos jóvenes (~66% mujeres), con edades entre 18 y 25 años (**Tabla 2**). Fue aprobado por los Comités de Ética de Investigación Humana de la Universidad de Granada y el Servicio Andaluz de Salud y el protocolo se ajustó a las directrices de la Declaración de Helsinki. El diseño del estudio fue un ensayo controlado aleatorizado de 3 brazos (duración 24 semanas): (i) programa de entrenamiento concurrente a intensidad vigorosa (Ej-Vig), (ii) programa de entrenamiento concurrente a intensidad moderada (Ej-Mod) y (iii) un grupo control. Se siguieron rigurosamente las pautas *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT). Los participantes del grupo de control recibieron información verbal sobre hábitos saludables, pero no participaron en programas de ejercicio específicos. Se tomaron muestras de sangre antes y después de la intervención siguiendo procedimientos estándar. Las muestras fueron centrifugadas y, utilizando un kit ELISA (Demeditec, Kiel, Alemania), se determinaron los niveles de S-Klotho utilizando dos tipos de anticuerpos específicos (pg/ml).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. ESTUDIO I

VALORES DE REFERENCIA DE LOS NIVELES DE S-KLOTHO MEDIDOS A TRAVÉS DE UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ENZIMÁTICO EN ADULTOS SANOS DE 18 A 85 AÑOS.

1. INTRODUCCIÓN

La proteína Klotho se considera actualmente un importante predictor del proceso de envejecimiento y esperanza de vida (526). El gen Klotho codifica la proteína Klotho, la cual se expresa fundamentalmente en el riñón, la paratiroides y el cerebro (526). Se han descrito tres subfamilias de Klotho (i.e., α -Klotho, β -Klotho y γ -Klotho) (526). Klotho, generalmente referido como α -Klotho, puede encontrarse unida a la membrana celular (527) o en forma soluble derivada de la escisión proteolítica de Klotho transmembrana (S-Klotho) (528). La proteína S-Klotho está presente en sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (528), y su vida media circulante se estima en 7.5 horas (528). Se conoce que ejerce múltiples funciones fisiológicas (e.g., atenuación del estrés oxidativo celular, supresión de la inflamación crónica y regulación de la homeostasis mineral) (529,530), considerándose un agente autocrino, endocrino y paracrino (531).

El envejecimiento se asocia con una reducción progresiva tanto de la expresión génica de Klotho como, posteriormente, de las concentraciones de S-Klotho (532). Sus niveles circulantes se derivan principalmente de un origen renal (533), siendo las alteraciones funcionales de este órgano una de las principales causas de la disminución relacionada con la edad de los niveles de S-Klotho (533). Se ha demostrado que el sexo biológico afecta los niveles de S-Klotho en animales (533). Sin embargo, no se ha visto tal dimorfismo sexual en humanos durante las etapas tempranas de la vida (533) y en individuos con diversas patologías (533), sugiriendo que la influencia del sexo en los niveles de S-Klotho es controvertida.

Aunque estudios previos han demostrado que el proceso de envejecimiento está relacionado con niveles reducidos de S-Klotho en pacientes (532,534), la no existencia de ensayos clínicos confiables que evalúen los valores circulantes de S-Klotho en

individuos sanos por edad y sexo es uno de los principales problemas para establecer sus VR (535). En este sentido, se ha sugerido que la prueba ELISA es una herramienta útil para la validación de las mediciones de S-Klotho, no solo en individuos sanos sino también en pacientes (e.g., diabetes o enfermedad renal crónica) (535). De manera similar, se ha propuesto que la técnica ELISA es un método excelente y útil para evaluar las funciones relacionadas con S-Klotho, especialmente aquellas relacionadas con el metabolismo mineral en voluntarios sanos (535). Se necesitan VR de este biomarcador para identificar el potencial envejecimiento fisiológico/metabólico prematuro, ya que el daño celular relacionado con el envejecimiento puede ocurrir a una edad temprana y no estar relacionado con la edad cronológica (535). Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo establecer los VR de los niveles séricos S-Klotho utilizando un ELISA en 346 adultos sanos de 18 a 85 años, dividiéndolos por grupos de edad y sexo. Hipotetizamos que los niveles de S-Klotho están afectados por la edad y el sexo en nuestra cohorte de individuos sanos del sur de España.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Participantes y diseño del estudio

Trescientos cuarenta y seis voluntarios sanos (143 hombres) con edades comprendidas entre 18 y 85 años participaron en el presente estudio analítico transversal de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión seleccionados. El diseño del estudio sigue el esquema convencional para establecer los VR de un biomarcador específico, propuesto originalmente por Siest y Wilding (535), que consiste en obtener una muestra de sangre de una población representativa objetivo (i.e., voluntarios caucásicos sanos) que presente una distribución gaussiana. El estudio se llevó a cabo siguiendo la última revisión de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Humana de la Junta de Andalucía [0838-N-2016].

Los criterios de inclusión fueron:

- Vivir en el sur de España (Andalucía).
- Tener una edad superior a 18 años.
- Misma proporción aproximada de hombres y mujeres.
- Raza caucásica.

Los criterios de exclusión fueron sufrir alguna de las patologías referidas a continuación:

- Enfermedad cardiovascular.
- Diabetes.
- Hipertensión no controlada.
- Déficits nutricionales.
- Patología renal crónica.

- Enfermedades que interfirieran en el metabolismo óseo.
- Infecciones crónicas recurrentes.
- Enfermedades autoinmunes.
- Cáncer o historia familiar de cáncer (primer grado).

2.2. Procesamiento de las muestras sanguíneas

Las muestras de sangre se solicitaron al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, cuya sede de coordinación se encuentra en Granada (España). Todas las muestras se recopilaron entre 2017 y 2020. Dado que el estudio no tiene implicaciones clínicas directas y que los voluntarios eran anónimos, no se requirió un consentimiento informado adicional además de los obtenidos por parte del Biobanco.

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena antecubital tras un ayuno nocturno de 12 horas y en condiciones de reposo (al menos 10 minutos antes de la extracción) en posición decúbito supino. Estas se recopilaron en tubos Vacutainer de 13x75 mm (Vacutainer SST, Becton Dickinson, Plymouth, Reino Unido). El suero se obtuvo mediante centrifugación (i.e., 4 minutos a 3000 rpm), se dividió en alícuotas y se almacenó inmediatamente a -80°C en el Biobanco. Se recibieron un total de cuatro alícuotas congeladas en tubos Eppendorf (1.5 mL, Eppendorf SE, Hamburgo, Alemania) con un volumen de 0.350 mL cada una (1.4 mL por voluntario).

2.3. Determinación de los niveles de S-Klotho

Los niveles de S-Klotho se midieron en una muestra de suero mediante un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA; número de referencia del kit: JP27998; laboratorios IBL International GmbH, Hamburgo, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. El método ELISA se basa en dos reacciones específicas antígeno-anticuerpo y en una medición semicuantitativa por espectrofotometría. La placa ELISA contiene 96

pocillos pretratados con un anticuerpo monoclonal de ratón purificado anti-humano (IgG) soluble α -Klotho (67G3). Durante el ensayo, se agregaron 100 μ L de calibradores prediluidos, controles y muestras diluidas de los voluntarios en pocillos separados, permitiendo que la proteína S-Klotho se una a los anticuerpos anti- α -Klotho soluble pre-inmovilizados en una primera incubación a 23°C durante 60 minutos. Se realizaron dos lavados consecutivos (i.e., tampón de lavado PBS-Tween20 al 0.05%, tampón de lavado pH 7.4) para eliminar la fracción no unida de la muestra al anticuerpo inmovilizado. Luego, se agregaron 100 μ L de un segundo anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a peroxidasa anti-humano (IgG) soluble α -Klotho (91F1) y se incubaron a 23°C durante 30 minutos, permitiendo la segunda unión del anticuerpo conjugado a la proteína S-Klotho. Se realizaron dos lavados adicionales para eliminar el exceso de anticuerpo conjugado a peroxidasa anti-humano soluble α -Klotho, y luego se agregó un sustrato cromogénico (i.e., 100 μ L de la enzima TMB [3,3',5,5'-tetrametilbencidina]). Tras una incubación adicional a 23°C durante 30 minutos, se agregaron 100 μ L de la solución H₂SO₄ 1N. La actividad enzimática se midió mediante un espectrofotómetro a 450 nm después de la adición de la solución (i.e., 30 minutos).

La concentración de S-Klotho se determinó a partir de una curva estándar construida por dilución seriada. Las densidades ópticas se registraron a 450 nm y se convirtieron en unidades de concentración en pg/mL mediante el hardware del analizador TRITURUS® y utilizando una regresión logística de cuatro parámetros para extrapolar la concentración de las muestras a partir de la curva estándar. Los coeficientes de variación intra e interensayo se calcularon midiendo dos dosis diferentes con proteína α -Klotho soluble purificada. Ambos coeficientes de variación oscilaron entre ~3% y ~10%. Todas las muestras se midieron en un solo análisis (en el mismo lote de ensayo), y se incluyeron

muestras de control de calidad enmascaradas en los lotes de ensayo para determinar el error de laboratorio en las mediciones.

2.4. Análisis estadístico

Todas las variables se expresan como media, desviación estándar e intervalo de referencia (percentil 5-percentil 95). La normalidad de los datos actuales se confirmó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y gráficos de probabilidad Q-Q. Los participantes se categorizaron según su edad en: (i) jóvenes (18-34.9 años), (ii) adultos de mediana edad (35-54.9 años) y (iii) adultos mayores (55-85 años).

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para examinar las diferencias en los niveles S-Klotho por categorías de edad. Se utilizó una prueba *t* de Student para muestras no apareadas con el fin de evaluar las diferencias entre sexos en los niveles de S-Klotho en cada categoría de edad. También se llevó a cabo un análisis de regresión lineal simple para estudiar la asociación entre la edad y los niveles de S-Klotho.

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS v.24, Inc. Chicago, IL, EE. UU.) y se crearon los gráficos con el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Se estableció la significancia estadística en $p \leq 0.05$.

3. RESULTADOS

III.1. Valores de referencia de los niveles de S-Klotho

La **Tabla 3** muestra los niveles de S-Klotho de los 346 participantes (58% mujeres) que se consideraron para determinar los VR de S-Klotho según el sexo y los diferentes grupos de edad que abarcan desde los 18 hasta los 85 años (i.e., 18-34 años [grupo joven], 35-54.9 años [grupo de mediana edad] y 55-85 años [grupo de mayores]). En el grupo de

18-34.9 años, había el doble de mujeres que de hombres. Las concentraciones de S-Klotho variaron desde 60 hasta 3309 pg/mL.

III.2. Los niveles de S-Klotho difieren según la edad, pero no por sexo

Las diferencias en los niveles de S-Klotho soluble entre los tres grupos de edad mencionados anteriormente, para todos los participantes y por sexo, se pueden encontrar en la **Figura 8**. Los niveles de S-Klotho disminuyeron significativamente al comparar los adultos jóvenes con los de mediana edad (-14.6%) y con los mayores (-34.4%) [$p=0.020$ y $p<0.001$, respectivamente; **Figura 8A**]. Los niveles de S-Klotho en adultos de mediana edad también fueron significativamente más altos (30.2%) que los obtenidos en adultos mayores ($P=0.002$; **Figura 8A**). Además, los niveles S-Klotho soluble fueron similares entre sexos en cada grupo de edad (todos los $p>0.08$), como se muestra en la **Figura 8B**.

Tabla 3. Valores de referencia de S-Klotho utilizando un ensayo de inmunoadsorción enzimática en adultos sanos de entre 18-85 años.

S-Klotho (pg/mL)				
	Media	Desviación Estándar	Intervalo de referencia (Percentil 5 – 95)	
Todos (n=346)	813.8	461.2	340.1	1672.5
Hombres (n=143)	728.3	412.0	323.4	1541.8
Mujeres (n=203)	874.0	485.0	385.4	1750.8
18-34.9 años (n=167)	932.6	575.6	392.6	2291.8
Hombres (n=57)	850.9	566.4	341.2	2282.8
Mujeres (n=110)	975.9	578.3	427.2	2345.5
35-54.9 años (n=88)	796.7	317.4	330.2	1364.6
Hombres (n=41)	733.9	249.6	324.6	1228.3
Mujeres (n=47)	851.5	360.2	312.6	1420.0
55-85 años (n=91)	612.1	198.2	235.8	918.6
Hombres (n=45)	567.9	192.5	190.4	851.5
Mujeres (n=46)	655.5	196.2	260.4	934.4

Los datos están expresados como media, desviación estándar y valores de referencia.

3.3. La edad está inversamente relacionada con los niveles séricos de S-Klotho

soluble

Se observó una asociación negativa significativa entre la edad y los niveles de S-Klotho soluble en nuestra cohorte objeto de estudio ($\beta=-0.300$; $R^2=0.151$; $p<0.001$;

Figura 9).

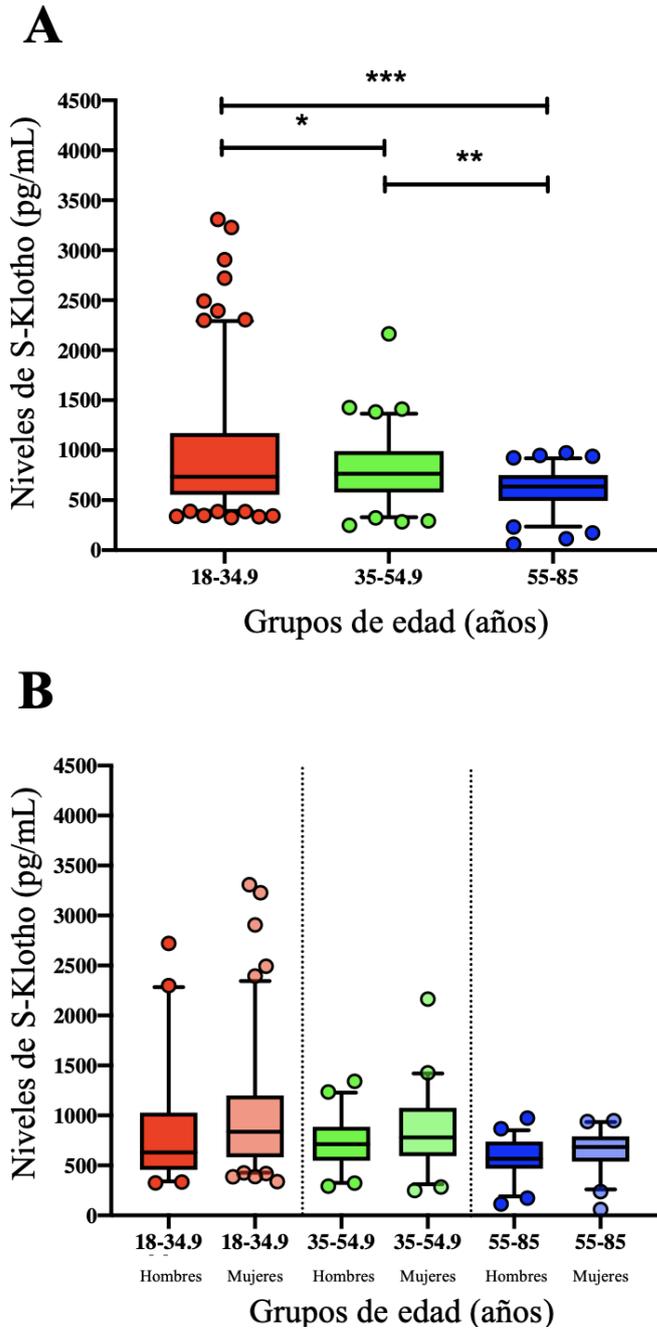


Figura 8. Niveles de S-Klotho en diferentes grupos de edad (i.e., 18-34 años [n=167] vs. 35-54.9 años [n=88] vs. 55-85 años [n=91]) para todos los participantes (Panel A) y segmentado por sexo (Panel B). Panel A: Análisis de varianza de 1 vía comparando los niveles de S-Klotho entre grupos de edad (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$). Panel B: T-Student para muestras no apareadas incluyendo el sexo como variable fija (hombres vs. mujeres) para determinar las diferencias en S-Klotho para cada grupo de edad. Los valores se expresan como medias±intervalo de referencia (percentil 5 - percentil 95).

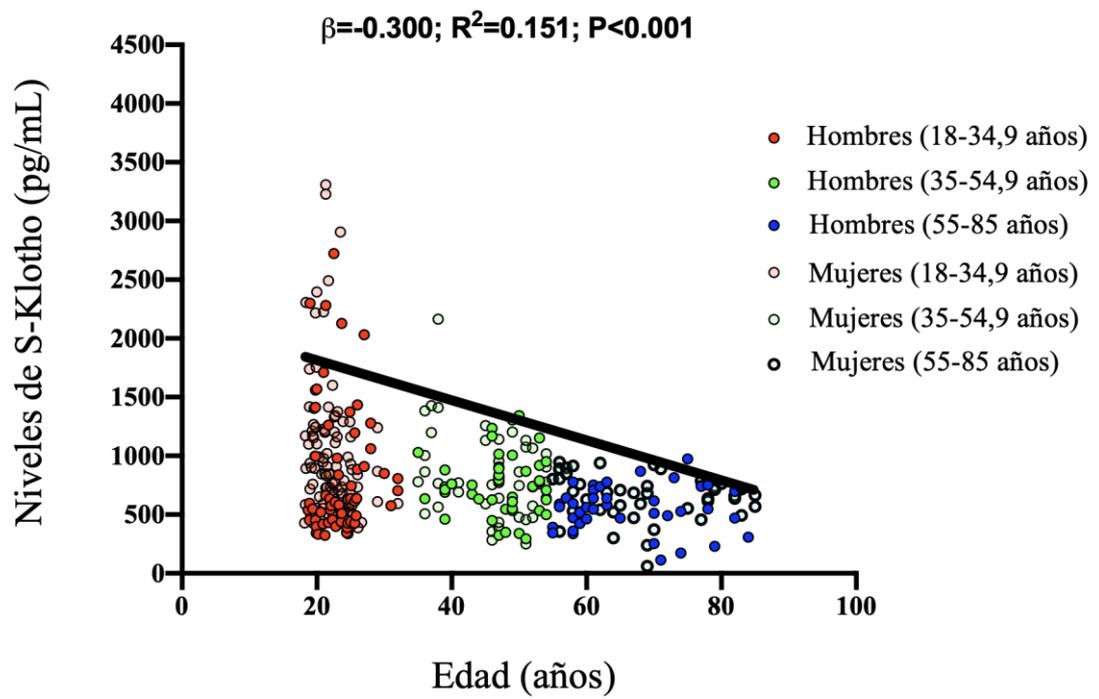


Figura 9. Asociación de la edad con los niveles de S-Klotho en adultos de 18 a 85 años. Los valores de β (coeficiente de regresión estandarizado), R^2 y p derivan de un análisis de regresión lineal simple.

4. DISCUSIÓN

En el presente estudio proporcionamos VR de los niveles de S-Klotho, específicamente en una cohorte considerable de adultos sanos, abarcando ambos sexos y un amplio rango de grupos de edad. Tal y como se había hipotetizado, S-Klotho está influenciado de manera significativa por la edad, alcanzando sus niveles más bajos en el grupo de adultos mayores, pero interesantemente, no se observaron diferencias por sexo.

Evidencia científica previa ha utilizado la técnica de ELISA para medir los niveles circulantes de S-Klotho en individuos sanos (i.e., edades comprendidas entre 0.1 y 88 años) (535). Como se observa en nuestro estudio (realizado en una cohorte más amplia de participantes), se detectaron diferencias por edad, pero no por sexo, aunque se observaron niveles medios más bajos de S-Klotho (es decir, 562 ± 146 pg/mL) en comparación con dicho ensayo previo (535). Del mismo modo, en una población con edades comprendidas entre 0 y 91 años, se observó una disminución progresiva de los niveles de S-Klotho a medida que la edad aumentaba, son de manifiesto nuevamente diferencias por sexo (535). En poblaciones con patologías tales como diabetes o enfermedad renal crónica, las concentraciones de S-Klotho medidas con ELISA tienden a disminuir debido a la alteración de parámetros tales como la bilirrubina o la hemoglobina glicosilada [19]. La técnica ELISA ha sido comparada con el uso de inmunoprecipitación-inmunotransferencia (IP-IT) para el análisis de los niveles circulantes de S-Klotho en pacientes con enfermedad renal crónica. Neyra et al. sugirieron que IP-IT es un método más adecuado para analizar S-Klotho soluble en estos sujetos, mostrando una mejor recuperación (captura) de la proteína Klotho y menos susceptibilidad a la variabilidad de los aditivos en las muestras en comparación con ELISA (535). Sin embargo, la técnica ELISA suele ser la preferida, ya que es un método más rápido, sencillo y útil en la

determinación analítica rutinaria de S-Klotho soluble, siendo IP-IT mucho más laboriosa y compleja (535). Pedersen et al. (535) también compararon dos ensayos inmunológicos diferentes (i.e., ensayo de fluorescencia con resolución temporal (TRF) vs. ELISA) con el objetivo de determinar los niveles de S-Klotho soluble en un total de 120 individuos sanos de 19 a 66 años. TRF reportó niveles sensiblemente más altos de S-Klotho que los proporcionados por ELISA, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos (535). Por otro lado, nuestros resultados reportan diferencias en los niveles de S-Klotho por edad, pero no por sexo, datos que concuerdan parcialmente con los obtenidos en ensayos previos a pesar de que nosotros obtuvimos valores medios de S-Klotho sustancialmente superiores (535). Las diferencias observadas en dichos valores en los estudios previos pueden deberse a que los participantes incluidos podrían ser pacientes con enfermedades o trastornos concomitantes no diagnosticados que pudieran estar relacionados con una disminución en los niveles de S-Klotho.

En el presente estudio, mostramos una relación negativa entre la edad y los niveles de S-Klotho obtenidos mediante ELISA, siendo el grupo más joven el que presentó la dispersión más alta. Solo dos estudios previos han informado sobre diferencias en los valores de S-Klotho en función de la edad (534,536), siendo esta asociación más fuerte cuando los rangos de edad de los individuos son más pronunciados. S-Klotho se expresa en gran medida en el riñón y el cerebro (537). El riñón se ve afectado de manera importante por el daño tisular relacionado con la edad (i.e., atrofia renal, glomeruloesclerosis o fibrosis tubulointersticial), aumentando el riesgo de enfermedad renal crónica y, por lo tanto, disminuyendo la expresión de Klotho (537); esto podría explicarse por la pérdida de funcionalidad de las células de la nefrona involucradas en su expresión. Además, el cerebro también se ve afectado por cambios relacionados con la edad que pueden suponer una regulación a la baja de la expresión de Klotho,

potencialmente causando enfermedades neurodegenerativas (537). Resulta evidente, por lo tanto, que la implementación de estrategias específicas para mantener una expresión adecuada de Klotho en el cerebro y los riñones es necesaria para prolongar la esperanza de vida (537). Además, las modificaciones metabólicas relacionadas con el envejecimiento (e.g., aumento del estrés oxidativo, inflamación crónica o adiposidad) podrían modular los niveles de S-Klotho (529) al inducir daño en los vasos sanguíneos y las estructuras histológicas de los microvasos, los cuales son muy similares en los riñones y el cerebro, reduciendo así la expresión de la proteína Klotho (538). Un enfoque con potencial futuro podría ser el uso de formas recombinantes de S-Klotho o administrar moléculas específicas para aumentar la expresión de todas las isoformas de Klotho (538). Es importante destacar que se han propuesto estrategias no farmacológicas como estrategias efectivas para aumentar los niveles de S-Klotho (e.g., ejercicio de intensidad moderada o vigorosa o una dieta baja en calorías y alta en proteínas) (538). Finalmente, la alta dispersión de S-Klotho observada en el grupo más joven podría deberse a una menor tendencia a presentar deficiencia de S-Klotho (539,540), sin embargo, se necesitan estudios adicionales para probar estas hipótesis.

La implementación de biomarcadores de envejecimiento fácilmente detectables es una herramienta útil para monitorear el proceso de envejecimiento, dado que la población envejecida está aumentando en todo el mundo (541). La proteína S-Klotho se ha descrito como un marcador muy sensible de enfermedad renal crónica, ya que sus niveles reflejan el grado de insuficiencia renal y se puede utilizar como indicador de la progresión de la de esta patología (541). S-Klotho (i) también puede ser considerada un nuevo biomarcador y objetivo potencial de tratamiento para complicaciones relacionadas con la diabetes (541) y (ii) podría actuar como un supresor de tumores y modulador de carcinomas (e.g., carcinomas hepatocelulares u ováricos), representando un biomarcador

potencial para su diagnóstico (542,543). Además, un estudio recientemente propone a la proteína S-Klotho como un biomarcador útil en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades respiratorias (e.g., displasia broncopulmonar e hipertensión pulmonar) en poblaciones jóvenes (528). De manera similar, se ha propuesto como un marcador de la deficiencia de hormona del crecimiento en niños con alteraciones del crecimiento (528).

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína S-Klotho puede ser considerada como un biomarcador útil en el diagnóstico y pronóstico de varias patologías y trastornos clínicos. Dado que las poblaciones envejecidas están aumentando en todo el mundo, son necesarios métodos analíticos rutinarios, simples y económicos en la práctica clínica (i) para identificar deficiencias de marcadores clave del envejecimiento (por ejemplo, S-Klotho) y (ii) para mejorar su estatus si este se encuentra disminuido (528). En conjunto, esta estrategia puede servir, no solo para mantener y mejorar la calidad de vida en personas de avanzada edad, sino también para disminuir los excesos de costos económicos a los sistemas de atención médica derivados de patologías que implican bajos niveles de S-Klotho (e.g., daño cerebral, enfermedad renal crónica o cáncer) (381,544). Por lo tanto, recomendamos la implementación de análisis rutinarios de S-Klotho para detectar alteraciones de este parámetro en poblaciones en riesgo de deficiencia de S-Klotho.

Los hallazgos del presente estudio deben tomarse con cautela, ya que presenta algunas limitaciones. En primer lugar, no medimos la forma intracelular y la forma de membrana celular del gen α -Klotho, lo que habría enriquecido el estudio. Sin embargo, su evaluación es muy costosa y compleja, lo cual imposibilita su implementación en análisis de rutina. En segundo lugar, no comparamos los niveles de S-Klotho obtenidos mediante la técnica de ELISA con otros métodos analíticos para comprobar si los VR aplican a dichos métodos. En tercer lugar, los resultados no se controlaron por índices de función renal

(e.g., aclaramiento de creatinina o cistatina C). Por último, los niveles S-Klotho pueden no reflejar suficientemente las concentraciones de tejido de la proteína Klotho, los cuales no pueden obtenerse sin la indicación clínica de una biopsia.

5. CONCLUSIÓN

El presente estudio proporciona, por primera vez, VR de S-Klotho soluble en adultos sanos con un amplio rango de edad según el sexo y utilizando la técnica ELISA. Tal y como hipotetizamos, la edad se asoció negativamente con los niveles de S-Klotho como consecuencia del declive fisiológico derivado del proceso de envejecimiento. Interesantemente, los valores de S-Klotho fueron similares según el sexo. Por lo tanto, recomendamos evaluaciones rutinarias de los niveles de S-Klotho como un marcador detectable, simple y económico del proceso de envejecimiento que debe ser verificado y mejorado en caso de deficiencia, especialmente en aquellas áreas con una alta tendencia a presentar poblaciones envejecidas, mejorando así su calidad de vida en la tercera edad.

II. ESTUDIO II

EFFECTO DOSIS-RESPUESTA DE UN PROGRAMA DE ENTRENAMIENTO SUPERVISADO DE 24 SEMANAS SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE S-KLOTHO EN ADULTOS JÓVENES: EL ENSAYO CONTROLADO ALEATORIO ACTIBATE.

1. INTRODUCCIÓN

El ejercicio físico es considerado en la actualidad como una de las herramientas más prometedoras no solo para mantener y mejorar la salud mental y física, sino también para reducir la incidencia de diversas patologías crónicas (545,546). De hecho, el ejercicio físico se ha propuesto como piedra angular en la prevención primaria de más de 35 enfermedades, incluyendo la obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y ciertos tipos de cáncer, entre otros (545,547). Gran cantidad de evidencia científica indica que el ejercicio físico se asocia con, al menos, un 30% de reducción en el riesgo de mortalidad por todas las causas, aumentando así la esperanza de vida tanto en sujetos sanos como en pacientes que padecen enfermedades crónicas (548).

La proteína α -Klotho es un parámetro multifuncional con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (384). Aunque el gen α -Klotho se expresa predominantemente en el riñón (i.e., túbulos contorneados distales), la glándula paratiroides y el plexo coroideo en el cerebro, ejerce funciones multiorgánicas actuando de manera paracrina y endocrina (448,549,550). De hecho, estudios anteriores han demostrado que α -Klotho funciona como regulador del metabolismo energético disminuyendo la inflamación celular y el estrés oxidativo (384,385,551). Concretamente, α -Klotho actúa como un factor circulante que se une a un receptor específico e inhibe la cascada de señalización intracelular de la insulina/factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) (384,385,551). Además, α -Klotho funciona (i) como beta-glucuronidasa, capaz de desglucosilar beta-glucurónidos esteroideos y el canal de calcio receptor potencial vallinoide-5 (TRPV5), y (ii) como cofactor esencial para la estimulación del FGFR por FGF23 (384,385,551). Estas funciones han posicionado a α -Klotho como factor clave para la regulación del metabolismo de minerales y vitamina D (552).

Numerosos estudios han demostrado claramente la efectividad del ejercicio físico en la salud y el funcionamiento celular (547,548). Sin embargo, los mecanismos moleculares y fisiológicos que explican estos efectos positivos relacionados con la salud no están completamente dilucidados. En este sentido, pocos estudios han investigado los efectos del ejercicio físico sobre los niveles plasmáticos de S-Klotho (457,553). Matsubara et al. (488) pusieron de manifiesto un aumento significativo de los niveles de S-Klotho en respuesta a 12 semanas de entrenamiento aeróbico de intensidad moderada en mujeres posmenopáusicas, mientras que datos recientes de nuestro laboratorio revelaron niveles más altos de S-Klotho en plasma tras 12 semanas de entrenamiento concurrente en comparación con un grupo control en adultos sedentarios de mediana edad (486). Estudiar los niveles de S-Klotho en adultos de mediana edad o mayores implica que la mayoría de dichos individuos ya tienen signos tempranos de enfermedad relacionada con el envejecimiento (554). Por lo tanto, el estudio de estos mecanismos fisiológicos en individuos jóvenes y saludables que no sufren tales trastornos es de interés clínico y científico (555). Es importante destacar que un metaanálisis reciente ha demostrado que la proteína circulante S-Klotho podría considerarse como una exerquina, sugiriendo que la intensidad del entrenamiento podría ser un factor clave para su modulación, implicando la implementación de intensidades más altas un mayor incremento en los niveles de S-Klotho (456). Sin embargo, aún se desconoce si el ejercicio de intensidad moderada vs. vigorosa podría ejercer una respuesta diferente en los niveles plasmáticos de S-Klotho. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo investigar el efecto dosis-respuesta de un programa de entrenamiento supervisado y concurrente de 24 semanas sobre los niveles plasmáticos de S-Klotho en adultos jóvenes.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. Participantes

Ciento cuarenta y cuatro adultos jóvenes (~66% mujeres), con edades entre 18 y 25 años, participaron en el estudio ACTIBATE (clinicalTrials.gov: NCT02365129) (556)(Sánchez-Delgado et al., 2015). El protocolo y los procedimientos del estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Humana tanto de la Universidad de Granada (n.º 924) como del Servicio Andaluz de Salud (Comité Ético de Investigación Provincial de Granada-Granada) [0838-N-2017], y se llevaron a cabo siguiendo las pautas más recientes de la Declaración de Helsinki. Los participantes fueron reclutados mediante (i) carteles colocados en diferentes ubicaciones de la Universidad de Granada, (ii) medios locales y (iii) redes sociales. Posteriormente, se pusieron el personal del equipo de investigación se pudo en contacto con los interesados por correo electrónico, Twitter o Facebook, y se proporcionó una explicación detallada de los objetivos del estudio, los criterios de inclusión, los procedimientos y la intervención de ejercicio físico. Los criterios de inclusión fueron: (i) no ser fumador, (ii) no tener ninguna condición patológica que pudiera agravarse con el ejercicio, (iii) presentar un índice de masa corporal entre 18.5 y 35 kg/m², (iv) ser sedentario (menos de 20 minutos de actividad física en menos de 3 días por semana), (v) tener un peso corporal estable durante las últimas 12 semanas y (vi) no estar tomando ningún medicamento, suplemento o medicación para enfermedades crónicas. Las evaluaciones iniciales y de seguimiento se realizaron en el Instituto Universitario Mixto de Deporte y Salud (iMUDS, Granada, España) entre septiembre de 2016 y junio de 2018. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado por escrito antes de su inscripción.

II.2. Diseño

El presente estudio es un análisis secundario del ensayo controlado aleatorio ACTIBATE, cuyo diseño y protocolos de estudio en su totalidad se detallan en el artículo metodológico del proyecto (556). En resumen, realizamos un ensayo controlado aleatorio de tres brazos basado en un programa de ejercicio físico de 24 semanas siguiendo estrictamente las pautas del CONSORT (557). Tras completar las evaluaciones en la línea base, los participantes fueron asignados aleatoriamente a uno de los 3 grupos objeto de estudio mediante un software de aleatorización simple generado por computadora (558): (i) programa de entrenamiento concurrente basado en las recomendaciones internacionales de actividad física a intensidad vigorosa (Ej-Vig), (ii) programa de entrenamiento concurrente basado en las recomendaciones internacionales de actividad física a intensidad moderada (Ej-Mod), y (iii) grupo control (sin ejercicio). El personal de investigación fue cegado en el proceso de aleatorización. Se instruyó a los participantes para que mantuvieran sus hábitos dietéticos y de actividad física durante el estudio, excepto aquellos asignados a los grupos de ejercicio, a quienes se les pidió que realizaran ejercicio adicional según el programa de intervención seleccionado.

II.3. Protocolo experimental

Los grupos Ej-Vig y Ej-Mod realizaron una intervención basada en entrenamiento concurrente siguiendo las pautas internacionales mínimas de actividad física (557,559). El volumen de entrenamiento aeróbico y de fuerza se estableció en 150 minutos/semana y 60 minutos/semana, respectivamente. El grupo Ej-Vig realizó un total de 75 minutos/semana al 80% de la Frecuencia Cardíaca de Reserva (FCres) y 75 minutos/semana al 60% de la FCres (i.e., intensidad moderada), mientras que el grupo Ej-Mod completó un total de 150 minutos/semana al 60% de la FCres. La intensidad del

entrenamiento de fuerza se estableció en el 70% de una repetición máxima (1-RM) y el 50% de 1-RM para los grupos Ej-Vig y Ej-Mod, respectivamente. Los participantes utilizaron tapices rodantes, cicloergómetros y elípticas para realizar el entrenamiento aeróbico, mientras que utilizaron máquinas neumáticas guiadas y ejercicios con discos, mancuernas y barras para realizar el entrenamiento de fuerza, el cual involucraba grandes grupos musculares de tren superior e inferior (e.g., empuje de cadera, tracción vertical, prensa de piernas, press de banca, sentadillas, press militar o peso muerto, entre otros). Para disminuir el riesgo de lesiones y aumentar la adherencia de los participantes al programa de ejercicio, se prescribieron ejercicios compensatorios que incluían ejercicios de estabilidad central y flexibilidad. La frecuencia de entrenamiento se estableció en 3 a 4 sesiones/semana a elección del participante, ajustando la duración de la sesión de entrenamiento para asegurar una dosis semanal similar de entrenamiento para todos los participantes. Dos de las 3 a 4 sesiones/semana se organizaron como sesiones de entrenamiento concurrente, mientras que 1 o 2 sesiones por semana se planificaron como sesiones de entrenamiento aeróbico. Programamos un calentamiento dinámico estandarizado al comienzo de la sesión de entrenamiento y un protocolo de vuelta a la calma basado en estiramiento global activo al final de todas las sesiones. Todas las sesiones fueron supervisadas por graduados en ciencias del deporte y se realizaron en grupos reducidos. Se llevó un registro sistemático de la asistencia diaria y la adherencia a la intensidad de resistencia preestablecida (i.e., mediante monitorización continua de la frecuencia cardíaca).

Se proporcionó información verbal sobre hábitos saludables (e.g., recomendaciones de actividad física) (557,559) y consejos dietéticos basados en patrones de dieta mediterránea (560) a los participantes asignados al grupo de control.

II.4. Procedimientos

II.4.1. Antropometría y composición corporal

Se realizaron evaluaciones antropométricas y de composición corporal antes y después del programa de intervención. El peso corporal y la estatura se midieron con una báscula electrónica SECA 799 (Seca corp., Hamburgo, Alemania) con una precisión de 0.1 kg y 0.1 cm, respectivamente. Los participantes se colocaron en el plano de Frankfurt, descalzos y con ropa ligera. Posteriormente, se calculó el índice de masa corporal dividiendo el peso corporal (kg) por la estatura al cuadrado (m). Se utilizó un escáner de absorciometría de rayos X de doble energía (Hologic, Inc., Bedford, MA, EE. UU.) para determinar la masa grasa, el tejido adiposo visceral y la masa magra siguiendo las recomendaciones del fabricante. También se calcularon el índice de masa grasa (i.e., masa grasa [kg] dividida por la estatura al cuadrado [m]) y el índice de masa magra (i.e., masa magra [kg] dividida por la estatura al cuadrado [m]).

II.4.2. Bioquímica clínica

Se tomaron muestras de sangre de la vena antecubital en el período basal y después del programa de intervención (durante la mañana y en condiciones de ayuno [i.e., 10-12 h]) siguiendo procedimientos estándar. Las muestras de sangre se recogieron en tubos Vacutainer (Vacutainer SST, Becton Dickinson, Plymouth, Reino Unido), se centrifugaron (i.e., 4 minutos a 3000 rpm), se alicuotaron y se congelaron a -80 °C hasta análisis posteriores. Se utilizó un kit ELISA (Demeditec, Kiel, Alemania) para determinar los niveles plasmáticos de S-Klotho utilizando dos tipos de anticuerpos específicos. Los niveles plasmáticos de S-Klotho se expresaron en pg/ml.

II.4.3. Ingesta dietética

Se registraron tres recordatorios dietéticos de 24 horas en días no consecutivos (2 en días laborables y 1 en el fin de semana) siguiendo procedimientos estándar (561), los cuales fueron realizados por un graduado en nutrición y dietética. Se utilizó un libro de fotografías a color para mejorar la calidad de la información proporcionada sobre los tamaños de las porciones de alimentos (562). La ingesta de energía y la ingesta de vitamina D, derivadas de los tres recordatorios dietéticos de 24 horas, se estimaron utilizando el software EvalFINUT® actualizado con datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y la Base de Datos Española de Composición de Alimentos.

II.5. Análisis estadístico

Los parámetros descriptivos se expresan como media y desviación estándar, a menos que se indique lo contrario. La normalidad de los datos se confirmó mediante la comprobación visual de histogramas, la prueba de Shapiro-Wilk y gráficos Q-Q.

Se llevó a cabo un ANOVA de una vía para testar diferencias entre grupos en la línea base. Seguidamente, realizamos un ANOVA de medidas repetidas para estudiar los cambios medios en los niveles plasmáticos de S-Klotho en función del tiempo (pre vs. post intervención), entre grupos y la interacción (tiempo \times grupo). Se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) para determinar el efecto de los grupos (factor fijo) sobre los cambios en los niveles plasmáticos de S-Klotho (i.e., niveles plasmáticos de S-Klotho post-intervención menos niveles plasmáticos de S-Klotho pre-intervención [variable dependiente]) ajustando por los valores basales. También se realizaron pruebas post hoc de Bonferroni con ajuste para comparaciones múltiples. Basándonos en consideraciones teóricas, también construimos modelos adicionales ajustando por sexo, índice de masa

corporal, ingesta de lácteos e ingesta total de vitamina D estimada a partir de recordatorios dietéticos de 24 horas.

Se realizaron análisis de regresión simples y múltiples (i.e., incluyendo el sexo en el modelo) para estudiar si los cambios en las variables antropométricas (i.e., índice de masa corporal) y de composición corporal (i.e., índice de masa grasa, tejido adiposo visceral e índice de masa magra) a lo largo del tiempo se asociaron con cambios en los niveles plasmáticos de S-Klotho inducidos por el programa de ejercicio.

Realizamos un análisis primario *per protocol*, ya que nuestro objetivo era evaluar la eficacia del programa de intervención (i.e., excluyendo a los participantes que no completaron el estudio). También se llevó a cabo un análisis de sensibilidad para comprobar la solidez de nuestros resultados, siguiendo el principio de *intention-to-treat* utilizando el método *baseline observation carried forward* y un análisis por protocolo excluyendo a los participantes que no registraron al menos el 70% de asistencia y el 40% de adherencia a la intensidad preestablecida.

La significación estadística fue considerada con valores p inferiores a 0.05. Dado que no se observó interacción significativa por sexo, construimos todos los modelos incluyendo a hombres y mujeres juntos. Considerando que el presente estudio se basa en un análisis secundario del ensayo controlado aleatorio ACTIBATE, no se realizó un cálculo específico de tamaño de muestra. Se utilizó el paquete Statistical Package for Social Sciences SPSS v.22.0 (IBM Corporation, Pittsburgh, PA, EE. UU.) para realizar el análisis estadístico y el GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) para generar los gráficos.

3. RESULTADOS

El diagrama de flujo del presente estudio se muestra en la **Figura 10**. Un total de 144 participantes aceptaron participar en el estudio. Fueron asignados aleatoriamente al grupo Ej-Vig (N=44), al grupo Ej-Mod (N=48) o al grupo control (N=54). Registramos una pérdida de seguimiento del 23%. Un total de 110 participantes (N=36 en el grupo Ej-Vig, N=36 en el grupo Ej-Mod y N=38 en el grupo control) completaron el programa de intervención, obteniendo un promedio de asistencia a las sesiones de ejercicio del 96% para el grupo Ej-Vig y del 95% para el grupo Ej-Mod. Es importante destacar que la presente intervención de ejercicio resultó en una disminución significativa de la masa grasa en ambos grupos Ej-Vig y Ej-Mod en comparación con el grupo de control, mientras que no se obtuvo ninguna mejora significativa relacionada con los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (563).

Las características descriptivas en la línea base de los participantes se pueden consultar en la **Tabla 4**. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en los niveles plasmáticos de S-Klotho en el inicio de la intervención (todas $p > 0.7$). Un total de 48 participantes presentaron sobrepeso/obesidad.

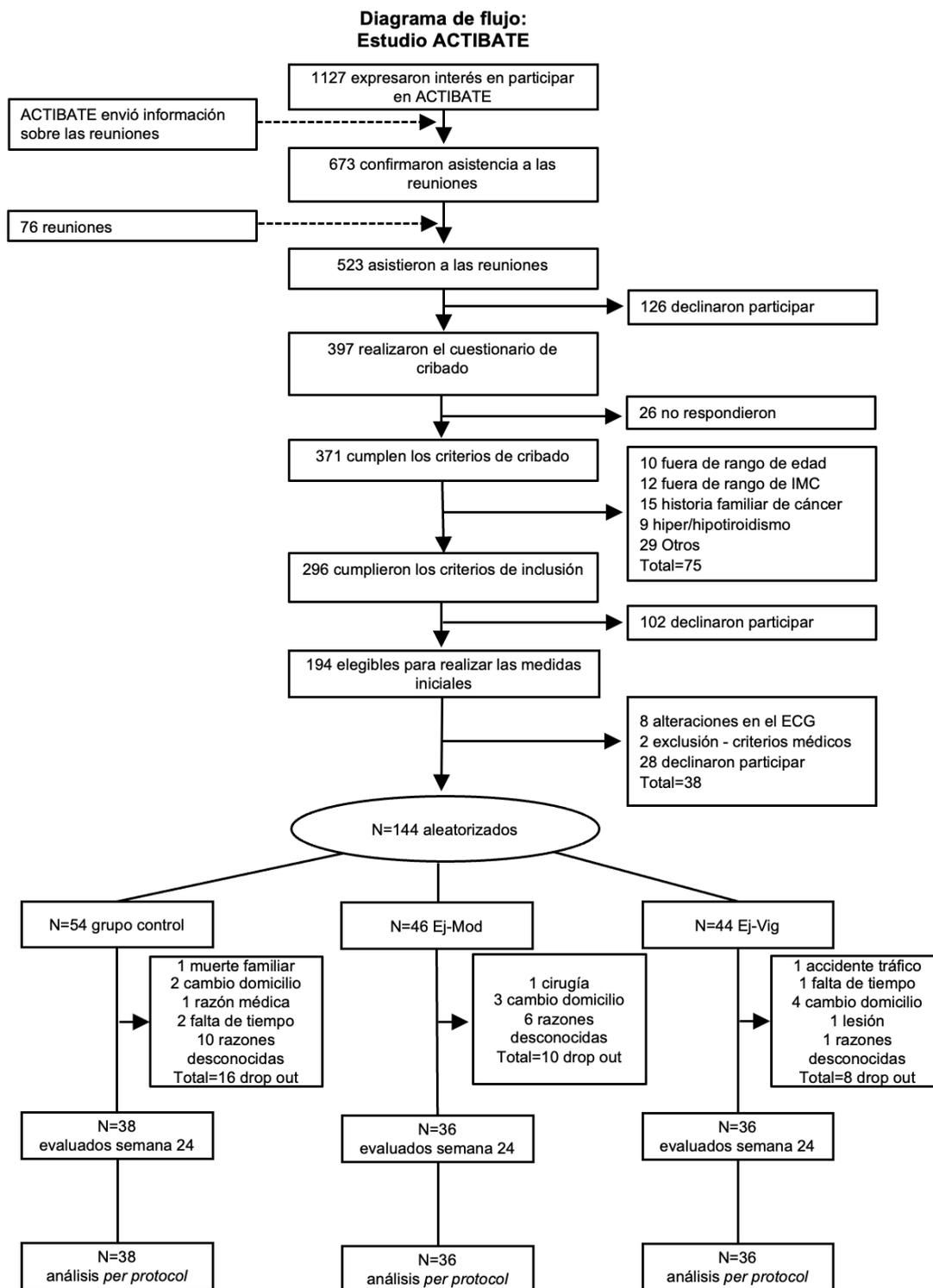


Figura 10: Diagrama de flujo. Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; ECG, electrocardiograma.

La **Figura 11** muestra los niveles plasmáticos de S-Klotho antes y después del programa de ejercicio. No se observaron diferencias significativas en función del tiempo en los niveles plasmáticos de S-Klotho ($P=0.497$; **Figura 11**), ni tampoco se obtuvo interacción tiempo \times grupo en los niveles de S-Klotho ($P=0.889$; **Figura 11**). El análisis ANCOVA no reveló diferencias significativas entre los grupos en los cambios de S-Klotho (-58.0 ± 346.1 pg/ml en el grupo Ej-Vig; 8.3 ± 395.2 pg/ml en el grupo Ej-Vig y -64.7 ± 187.4 pg/ml en el grupo control; $P=0.755$; **Figura 11**).

Tabla 4. Características descriptivas de los participantes del estudio incluidos en el análisis *per protocol*.

	Todos	Control	Ej-Vig	Ej-Vig	Valor <i>p</i>
Edad (años)	22,2 \pm 2,2	22,1 \pm 2,1	22,1 \pm 2,1	22,2 \pm 2,5	0,957
Sexo (n, [%])					
Hombres	35 (31,8)	15 (39,5)	10 (27,8)	10 (27,8)	
Mujeres	75 (68,2)	23 (60,5)	26 (72,2)	26 (72,2)	
Peso corporal (kg)	70,4 \pm 15,2	68,4 \pm 15,0	69,9 \pm 13,0	72,1 \pm 16,4	0,567
Altura (cm)	168,0 \pm 8,4	168,0 \pm 9,0	167,1 \pm 8,2	168,7 \pm 8,2	0,724
Índice de masa corporal (kg/m ²)	24,8 \pm 4,3	24,1 \pm 3,9	25,0 \pm 4,1	25,2 \pm 4,5	0,464
Masa grasa (kg)	24,9 \pm 8,3	22,9 \pm 7,2	25,4 \pm 8,7	26,0 \pm 8,5	0,211
Masa grasa (%)	35,8 \pm 7,5	34,2 \pm 7,2	36,7 \pm 8,4	36,5 \pm 6,8	0,275
Índice de masa grasa (kg/m ²)	8,83 \pm 2,87	8,12 \pm 2,53	9,17 \pm 3,21	9,12 \pm 2,74	0,204
Tejido adiposo visceral (g)	348,3 \pm 177,8	314,9 \pm 150,9	357,9 \pm 176,3	362,4 \pm 194,4	0,433
Masa magra (kg)	41,6 \pm 9,4	41,6 \pm 10,3	40,7 \pm 7,8	42,0 \pm 9,5	0,826
Índice de masa magra (kg/m ²)	14,62 \pm 2,31	14,58 \pm 2,44	14,46 \pm 1,92	14,64 \pm 2,34	0,893
Niveles de S-Klotho (pg/mL)	789,0 \pm 506,4	734,7 \pm 433,0	822,4 \pm 516,6	813,3 \pm 574,1	0,778

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Abreviaturas: Ej-Mod, grupo de intensidad moderada; Ej-Vig, grupo de intensidad vigorosa. Valor de *p* obtenido tras realizar un análisis de varianza entre grupos.

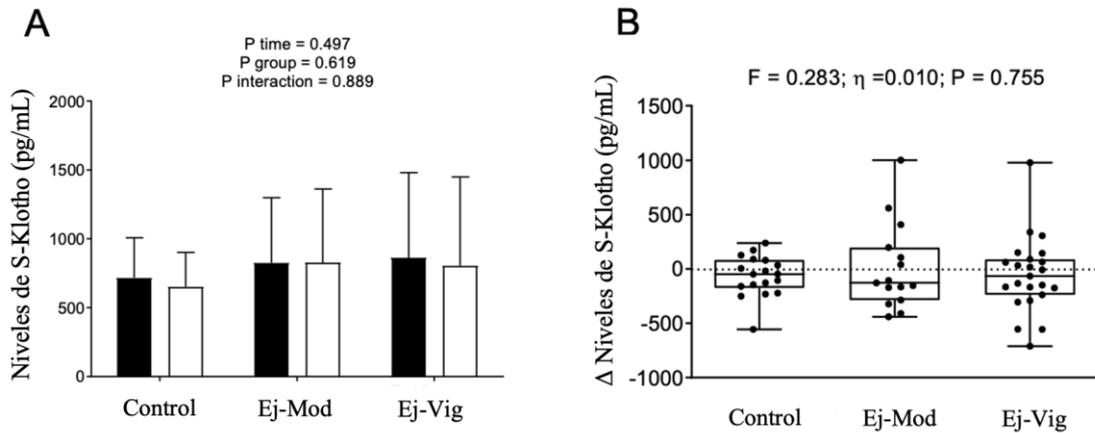


Figura 11. Niveles plasmáticos de S-Klotho antes y después del estudio de intervención. Valor p (tiempo, grupo e interacción [tiempo \times grupo]) del análisis de varianza de medidas repetidas. $p < 0.05$, prueba t de Student para muestras apareadas (Panel A). Las barras negras representan los valores iniciales, mientras que las barras blancas indican los resultados tras la intervención (Panel A). Cambios en los niveles plasmáticos de S-Klotho tras el programa de ejercicio en los 3 grupos, realizando un análisis de covarianza y ajustando los valores de la línea base, corrección post hoc de Bonferroni (Panel B). Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. Abreviaturas: Ej-Mod, grupo de intensidad moderada; Ej-Vig, grupo de intensidad vigorosa.

Las asociaciones de los cambios inducidos por el programa de ejercicio en las variables antropométricas y de composición corporal con los cambios en los niveles plasmáticos de S-Klotho se pueden ver en la **Figura 12**. No observamos asociaciones significativas entre los cambios en el índice de masa corporal, índice de masa grasa, tejido adiposo visceral e índice de masa magra con obtenidos en los niveles plasmáticos de S-Klotho (todos los $p > 0.1$; **Figura 12**).

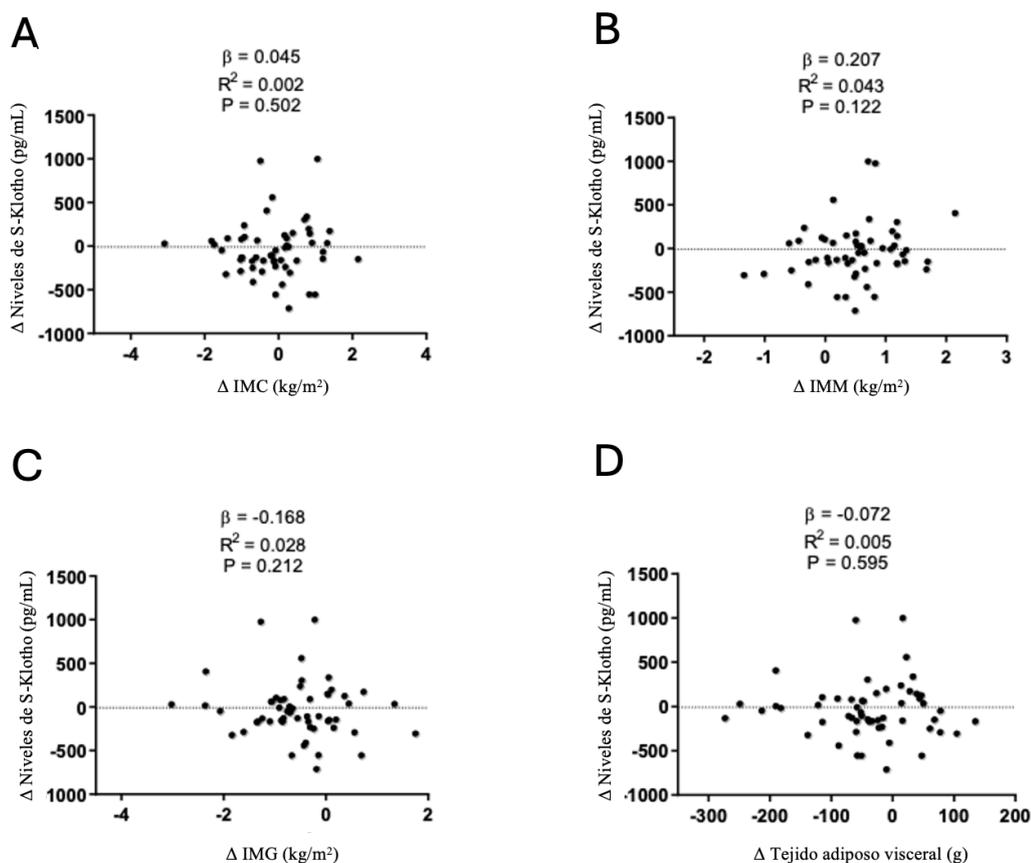


Figura 12. Asociación entre los cambios inducidos por el programa de intervención en variables antropométricas y de composición corporal (i.e., índice de masa corporal [IMC], índice de masa magra [IMM], índice de masa grasa [IMG] y tejido adiposo visceral) con cambios en los niveles plasmáticos de S-Klotho en adultos jóvenes sedentarios. β (coeficiente de regresión no estandarizado), R^2 y p obtenidos tras lanzar un análisis de regresión lineal simple.

Todos los hallazgos previamente comentados persistieron tras incluir el sexo, el índice de masa corporal, la ingesta de lácteos y la ingesta de vitamina D como covariables (todos los $p > 0.15$). Los análisis de sensibilidad corroboraron los resultados obtenidos por el análisis por protocolo.

4. DISCUSIÓN

El presente estudio buscó dilucidar dosis-respuesta de un programa de ejercicio concurrente y supervisado de 24 semanas sobre los niveles plasmáticos de S-Klotho en adultos jóvenes. El hallazgo principal de este trabajo fue que no se observaron cambios significativos entre grupos en los niveles plasmáticos de S-Klotho en respuesta al programa de intervención independientemente de la intensidad en nuestra cohorte objeto de estudio.

La proteína S-Klotho juega un papel clave en varios procesos fisiopatológicos y vías apoptóticas (563). De hecho, actúa como factor protector para prevenir y/o retrasar el desarrollo de numerosos trastornos metabólicos y musculoesqueléticos causados principalmente por un estado crónico proinflamatorio y por el estrés oxidativo (563). Concretamente, es un factor humoral con capacidad para contrarrestar procesos relacionados con el estrés oxidativo (383,384), así como la acción de numerosos factores inflamatorios (438), mediante la modulación de varias citoquinas y factores de crecimiento implicados en el envejecimiento celular (383,549).

Estudios previos han propuesto que el ejercicio físico puede aumentar los niveles de S-Klotho, pero sus efectos directos no se han investigado en profundidad. Matsubara et al. encontró un aumento significativo de los niveles plasmáticos de S-Klotho tras un programa de ejercicio aeróbico de 12 semanas en mujeres postmenopáusicas (488). Del mismo modo, un trabajo de nuestro laboratorio reveló que diferentes modalidades de entrenamiento (i.e., entrenamiento concurrente basado en las recomendaciones de actividad física de la OMS, entrenamiento interválico de alta intensidad y entrenamiento interválico de alta intensidad combinado con electroestimulación de cuerpo entero) también elevaron los niveles plasmáticos de S-Klotho en adultos sedentarios de mediana

edad (486). Sin embargo, estos resultados no concuerdan con los hallazgos del presente trabajo en el que no se observaron cambios significativos en los niveles plasmáticos de S-Klotho tras 24 semanas de entrenamiento concurrente, independientemente de la intensidad del ejercicio. Dos razones principales podrían explicar estas discrepancias. En primer lugar, la duración de nuestra intervención de ejercicio fue de 24 semanas, mientras que Matsubara et al. (488) y Amaro-Gahete et al. (486) realizaron una intervención de entrenamiento de 12 semanas. En segundo lugar, nuestros participantes eran individuos jóvenes sanos de 18 a 25 años con parámetros bioquímicos y cardiometabólicos dentro de rangos normales, mientras que estudios anteriores incluyeron a personas de mediana edad y mayores de 45 años (algunos de ellos con enfermedades crónicas cardiometabólicas) (488,564). Por lo tanto, parece que los efectos inducidos por el ejercicio en los parámetros relacionados con la salud en adultos jóvenes sanos serían independientes de los cambios en los niveles de S-Klotho, un hallazgo que concuerda con observaciones anteriores en los mismos participantes del estudio (563).

Los resultados de este trabajo deben interpretarse con precaución, ya que se deben tener en cuenta algunas limitaciones. El estudio es un análisis secundario de un ensayo controlado aleatorizado que no fue diseñado específicamente para responder a la pregunta objeto de estudio (563). En este contexto, aunque este tipo de investigaciones son propensas a sesgos de exploración de datos cuando se realizan de forma no planificada previamente, nosotros llevamos a cabo un análisis de potencia estadística basado en los resultados de trabajos anteriores (565) a partir de muestras de plasma disponibles. Sin embargo, reconocemos que la realización de múltiples comparaciones es una limitación con el análisis post hoc. Finalmente, solo se incluyeron adultos jóvenes sedentarios sanos (18-25 años) en el presente estudio, por lo que estos hallazgos no se pueden extender a individuos aún más jóvenes, mayores o activos.

5. CONCLUSIÓN

En conclusión, los datos del presente estudio sugieren que 24 semanas de entrenamiento concurrente supervisado no inducen cambios significativos en los niveles plasmáticos de S-Klotho, independientemente de la intensidad del ejercicio, en adultos jóvenes sanos. Aunque se ha sugerido en trabajos previos que el entrenamiento concurrente podría ser una estrategia eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de S-Klotho en personas mayores, este estímulo de ejercicio parece no ser óptimo para adultos jóvenes y sanos. Se necesitan más estudios para dilucidar si otras modalidades de entrenamiento son capaces de aumentar los niveles plasmáticos de S-Klotho en sujetos con estas características.

CONCLUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

I. CONCLUSIÓN GENERAL

En conclusión, esta Tesis Doctoral muestra que los niveles de S-Klotho son dependientes de la edad, pero no del sexo, en individuos sanos del sur de España y que un programa de ejercicio físico supervisado de 24 semanas no produce ningún efecto significativo en los niveles de S-Klotho en adultos jóvenes sanos.

II. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

1. ESTUDIO I

- La edad cronológica de un individuo se asocia negativamente a los niveles de S-Klotho como consecuencia del declive fisiológico derivado del proceso de envejecimiento.
- Tras determinar los VR de S-Klotho en individuos sanos, concluimos que no existe un dimorfismo sexual para este parámetro.

2. ESTUDIO II

- Un programa de entrenamiento concurrente supervisado de 24 semanas no indujo cambios significativos en los niveles plasmáticos de S-Klotho, independientemente de la intensidad del ejercicio, en adultos jóvenes sanos.

III. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Futuros estudios que tengan por objeto establecer VR de S-Klotho deben llevarse a cabo, (i) utilizando otras técnicas de determinación e (ii) incluyendo a individuos de otros países y etnias.
- Futuras intervenciones basadas en ejercicio físico de distintas modalidades (e.g., aeróbico o de fuerza), intensidades (e.g., moderada o vigorosa), frecuencias (e.g., 2, 3 o 5 días/semana), volúmenes (e.g., 20, 30 o 60 minutos/sesión) o duración (e.g., 12, 24 o 48 semanas) son necesarias para entender su efecto e implicaciones sobre los niveles plasmáticos de S-Klotho en diferentes poblaciones (e.g., individuos sanos o pacientes con patologías cardiometabólicas) de diversas edades (e.g., niños o adultos mayores).
- Futuras investigaciones combinando el ejercicio físico con otras intervenciones basadas en cambios del estilo de vida (e.g., nutricionales) son oportunas para determinar si existe un efecto sinérgico de las mismas sobre los niveles plasmáticos de S-Klotho.

REFERENCIAS

1. Real Academia Española de la Lengua. Definición de envejecimiento [Internet]. 2022. Available from: <https://dle.rae.es/envejecimiento>
2. Real Academia Española de la Lengua. Definición de viejo [Internet]. 2022. Available from: <https://dle.rae.es/viejo>
3. World Health Organization (WHO). Ageing and life course: Definition of an older or elderly person. [Internet]. 2021. Available from: <https://www.who.int/ageing/definitions/en/>
4. Department of Economic and Social Affairs PD. World Population Prospects 2022. United Nation. 2022. 1–54 p.
5. Alvarado García AM, Salazar Maya ÁM. Análisis del concepto de envejecimiento. Vol. 25, Gerokomos. scieloes; 2014. p. 57–62.
6. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud [Internet]. 2015. p. 1–32. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186471/WHO_FWC_ALC_15.0_1_spa.pdf
7. Ng TP, Zhong X, Gao Q, Gwee X, Chua DQL, Larbi A. Socio-Environmental, Lifestyle, Behavioural, and Psychological Determinants of Biological Ageing: The Singapore Longitudinal Ageing Study. *Gerontology*. 2020;66(6):603–13.
8. Real Academia Española de la Lengua. 2022. Definición de ancianidad. Available from: <https://dle.rae.es/ancianidad>

9. Levine ME. Modeling the rate of senescence: can estimated biological age predict mortality more accurately than chronological age? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013 Jun;68(6):667–74.
10. Singh S, Bajorek B. Defining “elderly” in clinical practice guidelines for pharmacotherapy. *Pharm Pract (Granada)*. 2014 Oct;12(4):489.
11. INE - Instituto Nacional de Estadística. Definición de índice de envejecimiento [Internet]. Available from: <https://www.ine.es/DEFIne/es/concepto.htm?c=5097&op=30264&p=1&n=20>
12. World Health Organization (WHO). Ageing and health [Internet]. 2022. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
13. United Nations. Día Internacional de las Personas de Edad. Resolución de la Asamblea General de las Naciones Unidas (A/RES/45/106) [Internet]. 1990. Available from: <http://envejecimiento.csic.es/documentacion/biblioteca/registro.htm?id=58920>
14. WHO. Estrategia y plan de acción mundiales sobre el envejecimiento y la salud 2016-2020: hacia un mundo en el que todas las personas puedan vivir una vida prolongada y saludable. World Health Organization. 2016; A69/A/CONF (2012):1–5.
15. Naciones Unidas. Declaración Política y Plan de Acción Internacional de Madrid sobre el Envejecimiento. *Debate Feminista*. 2002;62.
16. United Nations. TRANSFORMING OUR WORLD: THE 2030 AGENDA FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT [Internet]. 2015. Available from: <https://sdgs.un.org/publications/transforming-our-world-2030-agenda-sustainable-development-17981>
17. Havighurst RJ. Successful Aging¹. *Gerontologist*. 1961 Mar 1;1(1):8–13.

18. Rowe JW, Kahn RL. Successful aging. *Gerontologist*. 1997 Aug;37(4):433–40.
19. World Health Organization (WHO). *Growing Older - Staying Well Ageing and physical activity in everyday life*. 1998.
20. World Health Organization (WHO). *HEALTH AND AGEING: A DISCUSSION PAPER*. *Brunei International Medical Journal*. 2001.
21. Petretto DR, Pili R, Gaviano L, Matos López C, Zuddas C. Envejecimiento activo y de éxito o saludable: una breve historia de modelos conceptuales. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2016;51(4):229–41.
22. Carr D, Falchetta G, Wing IS. Population Aging and Heat Exposure in the 21st Century: Which U.S. Regions Are at Greatest Risk and Why? *Gerontologist*. 2024 Mar 1;64(3).
23. Rothenberg R, Lentzner HR, Parker RA. Population aging patterns: The expansion of mortality. *Journals of Gerontology*. 1991;46(2).
24. Monroe RT. The effect of aging of population on general health problems. *N Engl J Med* [Internet]. 1953 Aug 13 [cited 2024 Mar 24];249(7):277–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13087587/>
25. Rudnicka E, Napierała P, Podfigurna A, Męczekalski B, Smolarczyk R, Grymowicz M. The World Health Organization (WHO) approach to healthy ageing. *Maturitas*. 2020 Sep 1; 139:6–11.
26. United Nations. *World population prospects 2019 Highlights*. Department of Economic and Social Affairs. *World Population Prospects 2019*. 2019. 46 p.
27. United Nations Department of Economic and Social Affairs. *Population facts*. How certain are the United Nations global population projections? Vol. 6, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019. 4 p.
28. Coale AJ. The demographic transition. *Pak Dev Rev*. 1984;23(4):531–52.

29. Kirk D. Demographic Transition Theory. *Popul Stud (NY)*. 1996;50(3):361–87.
30. Vollset SE, Goren E, Yuan CW, Cao J, Smith AE, Hsiao T, et al. Fertility, mortality, migration, and population scenarios for 195 countries and territories from 2017 to 2100: a forecasting analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 2020;396(10258):1285–306.
31. Huenchuan S. Envejecimiento, personas mayores y Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible: perspectiva regional y de derechos humanos. *Libros de la CEPAL*. 2018. 1–259 p.
32. Lee R. The outlook for population growth. *Science*. 2011 Jul;333(6042):569–73.
33. World Health Organization (WHO). Estrategia Mundial para la Salud de la Mujer, el Niño y el Adolescente (2016-2030): salud del adolescente: informe de la Secretaría. Ginebra PP - Ginebra: Organización Mundial de la Salud;
34. INE - Instituto Nacional de Estadística. Mujeres y hombres en España 2021. Salud (actualizado 5 julio 2021) [Internet]. 2021. p. 13. Available from: https://www.ine.es/ss/Satellite?L=es_ES&c=INESeccion_C&cid=1259926380048&p=1254735110672&pagename=ProductosYServicios/PYSLayout#:~:text=En España entre 1999 y,básicos que publica el INE.
35. OCDE. Acerca de la OCDE [Internet]. Available from: <https://www.oecd.org/acerca/>
36. Kierzenkowski R, Pain N, Rusticelli E, Zwart S. OECD Economic Policy Paper. the Economic Consequences of Brexit: a Taxing Decision. 2016;16(April).
37. Gobierno de España. Ministerio de Inclusión SS y M. Gobierno de España. Ministerio de Inclusión, Seguridad Social y Migraciones: Jubilación. [Internet]. 2023. Available from: <https://www.seg->

social.es/wps/portal/wss/internet/Trabajadores/PrestacionesPensionesTrabajadore
s/10963/28393/28396/28472

38. OECD. Pensions at a Glance 2023. 2023. 236 p.
39. Abondio P, Sazzini M, Garagnani P, Boattini A, Monti D, Franceschi C, et al. The Genetic Variability of APOE in Different Human Populations and Its Implications for Longevity. *Genes (Basel)*. 2019 Mar;10(3).
40. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194–217.
41. Wang Y, Sun Z. Current understanding of klotho. *Ageing Research Reviews*. 2009.
42. Modig K, Rau R, Ahlbom A. Life expectancy: what does it measure? *BMJ Open*. 2020 Jul;10(7):e035932.
43. Vijg J, Campisi J. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*. 2008 Aug;454(7208):1065–71.
44. Brooks-Wilson AR. Genetics of healthy aging and longevity. *Hum Genet*. 2013 Dec;132(12):1323–38.
45. Gaigbe-Togbe V, Bassarsky L, Gu D, Spoorenberg T, Zeifman L. WHO-UN: World Population Prospects 2022. 2022. 1–54 p.
46. Taormina G, Ferrante F, Vieni S, Grassi N, Russo A, Mirisola MG. Longevity: Lesson from Model Organisms. *Genes (Basel)*. 2019 Jul;10(7).
47. Zhu X, Chen Z, Shen W, Huang G, Sedivy JM, Wang H, et al. Inflammation, epigenetics, and metabolism converge to cell senescence and ageing: the regulation and intervention. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):245.
48. Chiarugi V, Magnelli L, Ruggiero M. Apoptosis, senescence, immortalization and cancer. *Pharmacol Res*. 1994;30(4):301–15.

49. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiol Rev.* 2019 Apr 1;99(2):1047–78.
50. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 2014 May;509(7501):439–46.
51. Nacarelli T, Liu P, Zhang R. Epigenetic Basis of Cellular Senescence and Its Implications in Aging. *Genes (Basel).* 2017 Nov;8(12).
52. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5:99–118.
53. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonina 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.
54. Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, van Deursen JM. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science.* 2016 Oct;354(6311):472–7.
55. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest.* 2018 Apr;128(4):1238–46.
56. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jul;15(7):482–96.
57. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med.* 2016 Jan;22(1):78–83.
58. Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derks KWJ, Bourgeois BRM, et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell.* 2017 Mar;169(1):132-147.e16.

59. Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jul;15(7):397–408.
60. Baker GT 3rd, Sprott RL. Biomarkers of aging. *Exp Gerontol*. 1988;23(4–5):223–39.
61. Warner HR. The Future of Aging Interventions: Current Status of Efforts to Measure and Modulate the Biological Rate of Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59(7):B692–6.
62. American Federation for Aging Research. Infoaging Guide to Biomarkers of Aging. Infoaging guides. 2016;
63. Xia X, Chen W, McDermott J, Han JDJ. Molecular and phenotypic biomarkers of aging. *F1000Res*. 2017; 6:860.
64. Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S. Biological Age Predictors. *EBioMedicine*. 2017 Jul; 21:29–36.
65. Terrés-speziale AM, Sur I. Importancia de los marcadores biológicos en cronobiomedicina. 2001; 48:54–64.
66. Ekundayo B, Bleichert F. Origins of DNA replication. *PLoS Genet*. 2019 Sep;15(9): e1008320.
67. Prioleau MN, MacAlpine DM. DNA replication origins-where do we begin? *Genes Dev*. 2016 Aug;30(15):1683–97.
68. Turner KJ, Vasu V, Griffin DK. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells*. 2019 Jan;8(1).
69. O’Donnell M, Langston L, Stillman B. Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jul;5(7).
70. Burgers PMJ, Kunkel TA. Eukaryotic DNA Replication Fork. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun; 86:417–38.

71. Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K, Sugimoto K, Sugino A. Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968 Feb;59(2):598–605.
72. Ohki R, Tsurimoto T, Ishikawa F. In vitro reconstitution of the end replication problem. *Mol Cell Biol*. 2001 Sep;21(17):5753–66.
73. Lundblad V. The end replication problem: more than one solution. Vol. 3, *Nature medicine*. United States; 1997. p. 1198–9.
74. Srinivas N, Rachakonda S, Kumar R. Telomeres and Telomere Length: A General Overview. *Cancers (Basel)*. 2020 Feb 28;12(3):558.
75. Hernández Fernández RA. Telómeros y telomerasas. Vol. 18, *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. scielocu; 1999. p. 121–9.
76. Chuairé L. Telómeros y Telomerasa: Breve recuento de una historia iniciada por Hermann Müller y Bárbara McClintock. Vol. 37, *Colombia Médica* . scieloco ; 2006. p. 332–5.
77. Pfeiffer V, Lingner J. Replication of telomeres and the regulation of telomerase. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 May;5(5): a010405.
78. Cao Y, Bryan TM, Reddel RR. Increased copy number of the TERT and TERC telomerase subunit genes in cancer cells. *Cancer Sci*. 2008 Jun;99(6):1092–9.
79. Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet*. 2013 Sep;29(9):513–20.
80. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene*. 2002;21(4):564–79.
81. HAYFLICK L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res*. 1965 Mar; 37:614–36.

82. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998 Jan;279(5349):349–52.
83. Xu Z, Duc KD, Holcman D, Teixeira MT. The length of the shortest telomere as the major determinant of the onset of replicative senescence. *Genetics*. 2013 Aug;194(4):847–57.
84. Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WAM, Muñoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009 Aug;11(8):973–9.
85. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*. 1995 Sep;14(17):4240–8.
86. Bollmann FM. Targeting ALT: the role of alternative lengthening of telomeres in pathogenesis and prevention of cancer. *Cancer Treat Rev*. 2007 Dec;33(8):704–9.
87. Sun L, Chiang JY, Choi JY, Xiong ZM, Mao X, Collins FS, et al. Transient induction of telomerase expression mediates senescence and reduces tumorigenesis in primary fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Sep;116(38):18983–93.
88. Rossiello F, Jurk D, Passos JF, d’Adda di Fagagna F. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Cell Biol*. 2022 Feb;24(2):135–47.
89. Whitemore K, Vera E, Martínez-Nevado E, Sanpera C, Blasco MA. Telomere shortening rate predicts species life span. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jul;116(30):15122–7.
90. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 2019 Oct;179(4):813–27.

91. O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Mar;11(3):171–81.
92. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994 Dec;266(5193):2011–5.
93. Campisi J. Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act! *Mech Ageing Dev.* 2005 Jan;126(1):51–8.
94. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res.* 2013 Jan;319(2):133–41.
95. Wang P, Zhang Z, Sun Y, Liu X, Tong T. The two isomers of HDTIC compounds from *Astragali Radix* slow down telomere shortening rate via attenuating oxidative stress and increasing DNA repair ability in human fetal lung diploid fibroblast cells. *DNA Cell Biol.* 2010 Jan;29(1):33–9.
96. von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med.* 2005 Mar;5(2):197–203.
97. Andrew T, Aviv A, Falchi M, Surdulescu GL, Gardner JP, Lu X, et al. Mapping genetic loci that determine leukocyte telomere length in a large sample of unselected female sibling pairs. *Am J Hum Genet.* 2006 Mar;78(3):480–6.
98. Hjelmberg JB, Dalgård C, Möller S, Steenstrup T, Kimura M, Christensen K, et al. The heritability of leucocyte telomere length dynamics. *J Med Genet.* 2015 May;52(5):297–302.
99. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000 Nov;408(6809):239–47.

100. Passos JF, Saretzki G, von Zglinicki T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.* 2007;35(22):7505–13.
101. Jenny NS. Inflammation in aging: cause, effect, or both? *Discov Med.* 2012 Jun;13(73):451–60.
102. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015 Dec;21(12):1424–35.
103. Nordfjäll K, Eliasson M, Stegmayr B, Lundin S, Roos G, Nilsson PM. Increased abdominal obesity, adverse psychosocial factors and shorter telomere length in subjects reporting early ageing; the MONICA Northern Sweden Study. *Scand J Public Health.* 2008 Sep;36(7):744–52.
104. Bekaert S, De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Langlois M, et al. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. *Aging Cell.* 2007 Oct;6(5):639–47.
105. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, Richards JB, Gardner JP, Surdulescu GL, et al. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. *Arch Intern Med.* 2008 Jan;168(2):154–8.
106. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet.* 2005 Aug;366(9486):662–4.
107. Arsenis NC, You T, Ogawa EF, Tinsley GM, Zuo L. Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action. *Oncotarget.* 2017 Jul;8(27):45008–19.

108. Liu P, Zhang Y, Ma L. Telomere length and associated factors in older adults with hypertension. *J Int Med Res.* 2019 Nov;47(11):5465–74.
109. Zhan Y, Hägg S. Telomere length and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Cardiol.* 2019 May;34(3):270–4.
110. Piplani S, Prabhu M, Alemao NN, Akash C, Ram P, Ambar S, et al. Conventional Risk Factors, Telomere Length, and Ischemic Heart disease: Insights into the Mediation Analysis. *Genome Integr.* 2021; 12:1.
111. Bhattacharyya J, Mihara K, Bhattacharjee D, Mukherjee M. Telomere length as a potential biomarker of coronary artery disease. *Indian J Med Res.* 2017 Jun;145(6):730–7.
112. Fani L, Hilal S, Sedaghat S, Broer L, Licher S, Arp PP, et al. Telomere Length and the Risk of Alzheimer’s Disease: The Rotterdam Study. *J Alzheimers Dis.* 2020;73(2):707–14.
113. Aviv A. Telomeres and human somatic fitness. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006 Aug;61(8):871–3.
114. Waddington CH. *The strategy of the genes.* Routledge; 2014.
115. Zhang W, Qu J, Liu GH, Belmonte JCI. The ageing epigenome and its rejuvenation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Mar;21(3):137–50.
116. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, et al. Epigenetic predictor of age. *PLoS One.* 2011;6(6):e14821.
117. Gayon J. From Mendel to epigenetics: History of genetics. *C R Biol.* 2016;339(7–8):225–30.
118. De Cecco M, Criscione SW, Peckham EJ, Hillenmeyer S, Hamm EA, Manivannan J, et al. Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic

- changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell*. 2013 Apr;12(2):247–56.
119. Oblak L, van der Zaag J, Higgins-Chen AT, Levine ME, Boks MP. A systematic review of biological, social and environmental factors associated with epigenetic clock acceleration. *Ageing Res Rev*. 2021; 69:101348.
 120. Greenberg MVC, Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Oct;20(10):590–607.
 121. Costa D, Scognamiglio M, Fiorito C, Benincasa G, Napoli C. Genetic background, epigenetic factors and dietary interventions which influence human longevity. *Biogerontology*. 2019 Oct;20(5):605–26.
 122. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet*. 2018 Jun;19(6):371–84.
 123. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell*. 2013 Jan;49(2):359–67.
 124. Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, et al. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*. 2010 Apr;464(7290):927–31.
 125. Saunderson EA, Stepper P, Gomm JJ, Hoa L, Morgan A, Allen MD, et al. Hit-and-run epigenetic editing prevents senescence entry in primary breast cells from healthy donors. *Nat Commun*. 2017 Nov;8(1):1450.
 126. Black JC, Van Rechem C, Whetstine JR. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell*. 2012 Nov;48(4):491–507.

127. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007 Feb;128(4):693–705.
128. Ebert T, Tran N, Schurgers L, Stenvinkel P, Shiels PG. Ageing – Oxidative stress, PTMs and disease. *Mol Aspects Med*. 2022 Aug 1;86.
129. Kimura T. [Non-coding Natural Antisense RNA: Mechanisms of Action in the Regulation of Target Gene Expression and Its Clinical Implications]. *Yakugaku Zasshi*. 2020;140(5):687–700.
130. Gao Y, Liu C, Wu T, Liu R, Mao W, Gan X, et al. Current status and perspectives of non-coding RNA and phase separation interactions. *Biosci Trends*. 2022;16(5):330–45.
131. Li Y. Non-Coding RNA Performs Its Biological Function by Interacting with Macromolecules. Vol. 24, *International journal of molecular sciences*. Switzerland; 2023.
132. Abdelmohsen K, Gorospe M. Noncoding RNA control of cellular senescence. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2015;6(6):615–29.
133. Bu H, Wedel S, Cavinato M, Jansen-Dürr P. MicroRNA Regulation of Oxidative Stress-Induced Cellular Senescence. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:2398696.
134. Newman MA, Hammond SM. Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes Dev*. 2010 Jun;24(11):1086–92.
135. Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*. 2009 Feb;136(4):629–41.
136. Bergmann JH, Spector DL. Long non-coding RNAs: modulators of nuclear structure and function. *Curr Opin Cell Biol*. 2014 Feb; 26:10–8.
137. Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAUI-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature*. 2011 Feb;470(7333):284–8.

138. Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature*. 2014 Jan;505(7483):344–52.
139. Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*. 2011 Oct;147(2):358–69.
140. Kim E, Kim YK, Lee SJ V. Emerging functions of circular RNA in aging. *Trends Genet*. 2021 Sep;37(9):819–29.
141. Deelen J, Evans DS, Arking DE, Tesi N, Nygaard M, Liu X, et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies multiple longevity genes. *Nat Commun*. 2019 Aug 14;10(1):3669.
142. Nebel A, Flachsbarth F, Till A, Caliebe A, Blanché H, Arlt A, et al. A functional EXO1 promoter variant is associated with prolonged life expectancy in centenarians. *Mech Ageing Dev*. 2009 Oct;130(10):691–9.
143. Cardoso AL, Fernandes A, Aguilar-Pimentel JA, de Angelis MH, Guedes JR, Brito MA, et al. Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2018 Nov; 47:214–77.
144. Taormina G, Ferrante F, Vieni S, Grassi N, Russo A, Mirisola MG. Longevity: Lesson from Model Organisms. *Genes (Basel)*. 2019 Jul;10(7).
145. Bin-Jumah MN, Nadeem MS, Gilani SJ, Al-Abbasi FA, Ullah I, Alzarea SI, et al. Genes and Longevity of Lifespan. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan;23(3).
146. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 2002;415(6867):45–53.

147. Dumont P, Leu JIJ, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003 Mar;33(3):357–65.
148. van Heemst D, Mooijaart SP, Beekman M, Schreuder J, de Craen AJM, Brandt BW, et al. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp Gerontol.* 2005;40(1–2):11–5.
149. Soerensen M, Christensen K, Stevnsner T, Christiansen L. The Mn-superoxide dismutase single nucleotide polymorphism rs4880 and the glutathione peroxidase 1 single nucleotide polymorphism rs1050450 are associated with aging and longevity in the oldest old. *Mech Ageing Dev.* 2009 May;130(5):308–14.
150. Singh R, Kølvrå S, Bross P, Christensen K, Bathum L, Gregersen N, et al. Anti-inflammatory heat shock protein 70 genes are positively associated with human survival. *Curr Pharm Des.* 2010;16(7):796–801.
151. Altomare K, Greco V, Bellizzi D, Berardelli M, Dato S, DeRango F, et al. The allele (A)(-110) in the promoter region of the HSP70-1 gene is unfavorable to longevity in women. *Biogerontology.* 2003;4(4):215–20.
152. Ross OA, Curran MD, Crum KA, Rea IM, Barnett YA, Middleton D. Increased frequency of the 2437T allele of the heat shock protein 70-Hom gene in an aged Irish population. *Exp Gerontol.* 2003;38(5):561–5.
153. Montesanto A, Crocco P, Tallaro F, Pisani F, Mazzei B, Mari V, et al. Common polymorphisms in nitric oxide synthase (NOS) genes influence quality of aging and longevity in humans. *Biogerontology.* 2013 Apr;14(2):177–86.
154. Rose G, Crocco P, D'Aquila P, Montesanto A, Bellizzi D, Passarino G. Two variants located in the upstream enhancer region of human UCP1 gene affect gene

- expression and are correlated with human longevity. *Exp Gerontol.* 2011;46(11):897–904.
155. Dato S, Soerensen M, Lagani V, Montesanto A, Passarino G, Christensen K, et al. Contribution of genetic polymorphisms on functional status at very old age: A gene-based analysis of 38 genes (311 SNPs) in the oxidative stress pathway. *Exp Gerontol.* 2014; 52:23–9.
 156. Rose G, Crocco P, De Rango F, Montesanto A, Passarino G. Further support to the uncoupling-to-survive theory: the genetic variation of human UCP genes is associated with longevity. *PLoS One.* 2011;6(12): e29650.
 157. Vasa-Nicotera M, Brouillette S, Mangino M, Thompson JR, Braund P, Clemitson JR, et al. Mapping of a major locus that determines telomere length in humans. *Am J Hum Genet.* 2005 Jan;76(1):147–51.
 158. Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, et al. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan;107 Suppl (Suppl 1):1710–7.
 159. Lundblad V, Szostak JW. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell.* 1989 May;57(4):633–43.
 160. Roake CM, Artandi SE. Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jul;21(7):384–97.
 161. Zhou M, Jiang B, Xiong M, Zhu X. Association Between TERT rs2736098 Polymorphisms and Cancer Risk-A Meta-Analysis. *Front Physiol.* 2018; 9:377.
 162. Ullah M, Sun Z. Klotho Deficiency Accelerates Stem Cells Aging by Impairing Telomerase Activity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2019 Aug;74(9):1396–407.

163. Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2016 Mar;23(3): R143-55.
164. Gay-Bellile M, Véronèse L, Combes P, Eymard-Pierre E, Kwiatkowski F, Dauplat MM, et al. TERT promoter status and gene copy number gains: effect on TERT expression and association with prognosis in breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Sep;8(44):77540–51.
165. da Silva EM, Selenica P, Vahdatinia M, Pareja F, Da Cruz Paula A, Ferrando L, et al. TERT promoter hotspot mutations and gene amplification in metaplastic breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2021 Apr;7(1):43.
166. Li C, Wang X, Li Y, Zhang X, Sun M, Liu S, et al. Genetic polymorphisms in the TERT gene and susceptibility to non-small cell lung cancer in a Chinese Han population. *Cancer Manag Res*. 2018; 10:1487–95.
167. Tallet A, Nault JC, Renier A, Hysi I, Galateau-Sallé F, Cazes A, et al. Overexpression and promoter mutation of the TERT gene in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene*. 2014 Jul;33(28):3748–52.
168. Weyerer V, Eckstein M, Strissel PL, Wullweber A, Lange F, Tögel L, et al. TERT Promoter Mutation Analysis of Whole-Organ Mapping Bladder Cancers. *Genes (Basel)*. 2021 Feb;12(2).
169. Liu T, Brown TC, Juhlin CC, Andreasson A, Wang N, Bäckdahl M, et al. The activating TERT promoter mutation C228T is recurrent in subsets of adrenal tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2014 Jun;21(3):427–34.
170. Spiegl-Kreinecker S, Lötsch D, Neumayer K, Kastler L, Gojo J, Pirker C, et al. TERT promoter mutations are associated with poor prognosis and cell immortalization in meningioma. *Neuro Oncol*. 2018 Nov;20(12):1584–93.

171. Tang H, Wang H, Cheng X, Fan X, Yang F, Zhang M, et al. HuR regulates telomerase activity through TERC methylation. *Nat Commun.* 2018 Jun;9(1):2213.
172. Scarabino D, Peconi M, Pelliccia F, Corbo RM. Analysis of the Association Between TERC and TERT Genetic Variation and Leukocyte Telomere Length and Human Lifespan-A Follow-Up Study. *Genes (Basel).* 2019 Jan;10(2).
173. Concetti F, Lucarini N, Carpi FM, Di Pietro F, Dato S, Capitani M, et al. The functional VNTR MNS16A of the TERT gene is associated with human longevity in a population of Central Italy. *Exp Gerontol.* 2013 Jun;48(6):587–92.
174. Kim S, Bi X, Czarny-Ratajczak M, Dai J, Welsh DA, Myers L, et al. Telomere maintenance genes SIRT1 and XRCC6 impact age-related decline in telomere length but only SIRT1 is associated with human longevity. *Biogerontology.* 2012 Apr;13(2):119–31.
175. Jiao F, Gong Z. The Beneficial Roles of SIRT1 in Neuroinflammation-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2020; 2020:6782872.
176. Chen C, Zhou M, Ge Y, Wang X. SIRT1 and aging related signaling pathways. *Mech Ageing Dev.* 2020 Apr; 187:111215.
177. Figarska SM, Vonk JM, Boezen HM. SIRT1 polymorphism, long-term survival and glucose tolerance in the general population. *PLoS One.* 2013;8(3): e58636.
178. Zhang WG, Bai XJ, Chen XM. SIRT1 variants are associated with aging in a healthy Han Chinese population. *Clin Chim Acta.* 2010 Nov;411(21–22):1679–83.
179. Diao Z, Ji Q, Wu Z, Zhang W, Cai Y, Wang Z, et al. SIRT3 consolidates heterochromatin and counteracts senescence. *Nucleic Acids Res.* 2021 May;49(8):4203–19.

180. Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis.* 2014 Dec;72 Pt A:3–12.
181. Eggertsen G, Tegelmann R, Ericsson S, Angelin B, Berglund L. Apolipoprotein E polymorphism in a healthy Swedish population: variation of allele frequency with age and relation to serum lipid concentrations. *Clin Chem.* 1993 Oct;39(10):2125–9.
182. Schächter F, Faure-Delanef L, Guénot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, et al. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Genet.* 1994 Jan;6(1):29–32.
183. Jian-Gang Z, Yong-Xing M, Chuan-Fu W, Pei-Fang L, Song-Bai Z, Nui-Fan G, et al. Apolipoprotein E and longevity among Han Chinese population. *Mech Ageing Dev.* 1998 Aug;104(2):159–67.
184. Sebastiani P, Gurinovich A, Nygaard M, Sasaki T, Sweigart B, Bae H, et al. APOE Alleles and Extreme Human Longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2019 Jan;74(1):44–51.
185. Ewbank DC. The APOE gene and differences in life expectancy in Europe. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2004 Jan;59(1):16–20.
186. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 2004 Jul;141(2):137–47.
187. Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.* 2007 Jan;39(1):17–23.
188. Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Stengård JH, et al. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for

- the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am J Hum Genet.* 2000 Oct;67(4):881–900.
189. Soerensen M, Dato S, Tan Q, Thinggaard M, Kleindorp R, Beekman M, et al. Human longevity and variation in GH/IGF-1/insulin signaling, DNA damage signaling and repair and pro/antioxidant pathway genes: cross sectional and longitudinal studies. *Exp Gerontol.* 2012 May;47(5):379–87.
 190. Kenyon C, Murphy CT. Enrichment of regulatory motifs upstream of predicted DAF-16 targets. *Nat Genet.* 2006 Apr;38(4):397–8.
 191. Kenyon C. The Plasticity of Aging: Insights from Long-Lived Mutants. *Cell.* 2005 Feb;120(4):449–60.
 192. Christensen K, Johnson TE, Vaupel JW. The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. *Nat Rev Genet.* 2006 Jun;7(6):436–48.
 193. Herndon LA, Schmeissner PJ, Dudaronek JM, Brown PA, Listner KM, Sakano Y, et al. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature.* 2002 Oct;419(6909):808–14.
 194. Pawlikowska L, Hu D, Huntsman S, Sung A, Chu C, Chen J, et al. Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity. *Aging Cell.* 2009 Aug 21;8(4):460–72.
 195. Lunetta KL, D'Agostino RB, Karasik D, Benjamin EJ, Guo CY, Govindaraju R, et al. Genetic correlates of longevity and selected age-related phenotypes: a genome-wide association study in the Framingham Study. *BMC Med Genet.* 2007 Sep 19;8(S1): S13.
 196. Li Y, Wang WJ, Cao H, Lu J, Wu C, Hu FY, et al. Genetic association of FOXO1A and FOXO3A with longevity trait in Han Chinese populations. *Hum Mol Genet.* 2009 Dec 15;18(24):4897–904.

197. Willcox BJ, Donlon TA, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, et al. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Sep 16;105(37):13987–92.
198. Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanché H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, et al. Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Feb 24;106(8):2700–5.
199. Van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Brandt BW, Zwaan BJ, et al. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell*. 2005 Apr 28;4(2):79–85.
200. Bonafè M, Barbieri M, Marchegiani F, Olivieri F, Ragno E, Giampieri C, et al. Polymorphic Variants of Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Receptor and Phosphoinositide 3-Kinase Genes Affect IGF-I Plasma Levels and Human Longevity: Cues for an Evolutionarily Conserved Mechanism of Life Span Control. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Jul;88(7):3299–304.
201. Kojima T, Kamei H, Aizu T, Arai Y, Takayama M, Nakazawa S, et al. Association analysis between longevity in the Japanese population and polymorphic variants of genes involved in insulin and insulin-like growth factor 1 signaling pathways. *Exp Gerontol*. 2004 Nov;39(11–12):1595–8.
202. Favatier F, Bornman L, Hightower LE, Günther E, Polla BS. Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? *Cell Stress Chaperones*. 1997 Sep;2(3):141–55.
203. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab*. 2016 Feb;23(2):303–14.

204. Comfort A. Test-Battery to Measure Ageing-Rate in Man. *The Lancet*. 1969 Dec;294(7635):1411–5.
205. Sprott RL. Biomarkers of aging and disease: Introduction and definitions. *Exp Gerontol*. 2010 Jan;45(1):2–4.
206. Levine ME. Modeling the Rate of Senescence: Can Estimated Biological Age Predict Mortality More Accurately Than Chronological Age? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013 Jun 1;68(6):667–74.
207. American Federation for Aging Research. Infoaging Guide to Biomarkers of Aging. Infoaging guides [Internet]. 2016; Available from: https://www.afar.org/imported/AFAR_BIOMARKERS_OF_AGING_2016.pdf
208. Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*. 2018 Apr 18;10(4):573–91.
209. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*. 2007 Jan;128(1):92–105.
210. Yu BP, Chung HY. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech Ageing Dev*. 2006 May;127(5):436–43.
211. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH, et al. Associations of elevated Interleukin-6 and C-Reactive protein levels with mortality in the elderly**Access the “Journal Club” discussion of this paper at <http://www.elsevier.com/locate/ajmselect/>. *Am J Med*. 1999 May;106(5):506–12.

212. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, et al. Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 2009 Jan;8(1):18–30.
213. Taaffe DR, Harris TB, Ferrucci L, Rowe J, Seeman TE. Cross-sectional and Prospective Relationships of Interleukin-6 and C-Reactive Protein With Physical Performance in Elderly Persons: MacArthur Studies of Successful Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2000 Dec 1;55(12):M709–15.
214. Weaver JD, Huang MH, Albert M, Harris T, Rowe JW, Seeman TE. Interleukin-6 and risk of cognitive decline. *Neurology.* 2002 Aug 13;59(3):371–8.
215. Arai Y, Martin-Ruiz CM, Takayama M, Abe Y, Takebayashi T, Koyasu S, et al. Inflammation, But Not Telomere Length, Predicts Successful Ageing at Extreme Old Age: A Longitudinal Study of Semi-supercentenarians. *EBioMedicine.* 2015 Oct;2(10):1549–58.
216. Murata S, Ebeling M, Meyer AC, Schmidt-Mende K, Hammar N, Modig K. Blood biomarker profiles and exceptional longevity: comparison of centenarians and non-centenarians in a 35-year follow-up of the Swedish AMORIS cohort. *Geroscience.* 2023 Sep 19;46(2):1693–702.
217. Cappola AR, Auchus RJ, El-Hajj Fuleihan G, Handelsman DJ, Kalyani RR, McClung M, et al. Hormones and Aging: An Endocrine Society Scientific Statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2023 Jul 14;108(8):1835–74.
218. Nass R, Farhy LS, Liu J, Pezzoli SS, Johnson ML, Gaylinn BD, et al. Age-Dependent Decline in Acyl-Ghrelin Concentrations and Reduced Association of Acyl-Ghrelin and Growth Hormone in Healthy Older Adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Feb 1;99(2):602–8.

219. Deuschle M, Gotthardt U, Schweiger U, Weber B, Körner A, Schmider J, et al. With aging in humans the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal system increases and its diurnal amplitude flattens. *Life Sci.* 1997 Oct;61(22):2239–46.
220. Purnell JQ, Brandon DD, Isabelle LM, Loriaux DL, Samuels MH. Association of 24-Hour Cortisol Production Rates, Cortisol-Binding Globulin, and Plasma-Free Cortisol Levels with Body Composition, Leptin Levels, and Aging in Adult Men and Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jan;89(1):281–7.
221. Wilkinson CW, Peskind ER, Raskind MA. Decreased Hypothalamic-Pituitary Adrenal Axis Sensitivity to Cortisol Feedback Inhibition in Human Aging. *Neuroendocrinology.* 1997;65(1):79–90.
222. Tigancescu A, Walker EA, Hardy RS, Mayes AE, Stewart PM. Localization, Age- and Site-Dependent Expression, and Regulation of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Skin. *Journal of Investigative Dermatology.* 2011 Jan;131(1):30–6.
223. Kilgour AHM, Gallagher IJ, MacLulich AMJ, Andrew R, Gray CD, Hyde P, et al. Increased Skeletal Muscle 11 β HSD1 mRNA Is Associated with Lower Muscle Strength in Ageing. *PLoS One.* 2013 Dec 31;8(12): e84057.
224. Morelli V, Eller-Vainicher C, Salcuni AS, Coletti F, Iorio L, Muscogiuri G, et al. Risk of new vertebral fractures in patients with adrenal incidentaloma with and without subclinical hypercortisolism: A multicenter longitudinal study. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2011 Aug 1;26(8):1816–21.
225. Di Dalmazi G, Vicennati V, Garelli S, Casadio E, Rinaldi E, Giampalma E, et al. Cardiovascular events and mortality in patients with adrenal incidentalomas that are either non-secreting or associated with intermediate phenotype or subclinical

- Cushing's syndrome: a 15-year retrospective study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 May;2(5):396–405.
226. ORENTREICH N, BRIND JL, RIZER RL, VOGELMAN JH. Age Changes and Sex Differences in Serum Dehydroepiandrosterone Sulfate Concentrations throughout Adulthood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984 Sep;59(3):551–5.
227. Schwartz AG. Dehydroepiandrosterone, Cancer, and Aging. *Aging Dis.* 2022;13(2):423.
228. Rutkowski K, Sowa P, Rutkowska-Talipska J, Kuryliszyn-Moskal A, Rutkowski R. Dehydroepiandrosterone (DHEA): Hypes and Hopes. *Drugs.* 2014 Jul 15;74(11):1195–207.
229. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation.* 2012 Sep 4;122(9):3035–43.
230. Taylor PN, Lansdown A, Witczak J, Khan R, Rees A, Dayan CM, et al. Age-related variation in thyroid function – a narrative review highlighting important implications for research and clinical practice. *Thyroid Res.* 2023 Apr 3;16(1):7.
231. Barbesino G. Thyroid Function Changes in the Elderly and Their Relationship to Cardiovascular Health: A Mini-Review. *Gerontology.* 2019;65(1):1–8.
232. van Vliet NA, van Heemst D, Almeida OP, Åsvold BO, Aubert CE, Bae J Bin, et al. Association of Thyroid Dysfunction With Cognitive Function. *JAMA Intern Med.* 2021 Nov 1;181(11):1440.
233. Chaker L, Baumgartner C, den Elzen WPJ, Ikram MA, Blum MR, Collet TH, et al. Subclinical Hypothyroidism and the Risk of Stroke Events and Fatal Stroke: An Individual Participant Data Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Jun;100(6):2181–91.

234. Rodondi N, den Elzen WPJ, Bauer DC, Cappola AR, Razvi S, Walsh JP, et al. Subclinical Hypothyroidism and the Risk of Coronary Heart Disease and Mortality. *JAMA*. 2010 Sep 22;304(12):1365.
235. Gencer B, Collet TH, Virgini V, Bauer DC, Gussekloo J, Cappola AR, et al. Subclinical Thyroid Dysfunction and the Risk of Heart Failure Events. *Circulation*. 2012 Aug 28;126(9):1040–9.
236. Rieben C, Segna D, da Costa BR, Collet TH, Chaker L, Aubert CE, et al. Subclinical Thyroid Dysfunction and the Risk of Cognitive Decline: a Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Dec;101(12):4945–54.
237. Collet TH, Gussekloo J, Bauer DC, den Elzen WPJ, Cappola AR, Balmer P, et al. Subclinical Hyperthyroidism and the Risk of Coronary Heart Disease and Mortality. *Arch Intern Med*. 2012 May 28;172(10).
238. Blum MR, Bauer DC, Collet TH, Fink HA, Cappola AR, da Costa BR, et al. Subclinical Thyroid Dysfunction and Fracture Risk. *JAMA*. 2015 May 26;313(20):2055.
239. Pusceddu I, Farrell CJL, Di Pierro AM, Jani E, Herrmann W, Herrmann M. The role of telomeres and vitamin D in cellular aging and age-related diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2015 Jan 1;53(11).
240. Bouillon R, Bikle D. Vitamin D Metabolism Revised: Fall of Dogmas. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2019 Nov 1;34(11):1985–92.
241. Ordóñez-Morán P, Muñoz A. Nuclear receptors: Genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle*. 2009 Jun 31;8(11):1675–80.
242. Christakos S, Dhawan P, Porta A, Mady LJ, Seth T. Vitamin D and intestinal calcium absorption. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Dec;347(1–2):25–9.

243. Hill A, Hill QA. Autoimmune hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2018 Nov;2018(1):382–9.
244. de Jongh RT, van Schoor NM, Lips P. Changes in vitamin D endocrinology during aging in adults. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Sep; 453:144–50.
245. Gonçalves de Carvalho CMR, Ribeiro SML. Aging, low-grade systemic inflammation and vitamin D: a mini-review. *Eur J Clin Nutr*. 2017 Apr 28;71(4):434–40.
246. Chalcraft JR, Cardinal LM, Wechsler PJ, Hollis BW, Gerow KG, Alexander BM, et al. Vitamin D Synthesis Following a Single Bout of Sun Exposure in Older and Younger Men and Women. *Nutrients*. 2020 Jul 27;12(8):2237.
247. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S, et al. Vitamin D3 and Calcium to Prevent Hip Fractures in Elderly Women. *New England Journal of Medicine*. 1992 Dec 3;327(23):1637–42.
248. McCullough ML, Zoltick ES, Weinstein SJ, Fedirko V, Wang M, Cook NR, et al. Circulating Vitamin D and Colorectal Cancer Risk: An International Pooling Project of 17 Cohorts. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2019 Feb 1;111(2):158–69.
249. Zhang H, Zhang H, Wen X, Zhang Y, Wei X, Liu T. Vitamin D Deficiency and Increased Risk of Bladder Carcinoma: A Meta-Analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015;37(5):1686–92.
250. Visvanathan K, Mondul AM, Zeleniuch-Jacquotte A, Wang M, Gail MH, Yaun SS, et al. Circulating vitamin D and breast cancer risk: an international pooling project of 17 cohorts. *Eur J Epidemiol*. 2023 Jan 3;38(1):11–29.

251. O'Brien KM, Keil AP, Harmon QE, Jackson CL, White AJ, Díaz-Santana M V., et al. Vitamin D Supplement Use and Risk of Breast Cancer by Race-Ethnicity. *Epidemiology*. 2022 Jan 16;33(1):37–47.
252. Muller DC, Hodge AM, Fanidi A, Albanes D, Mai XM, Shu XO, et al. No association between circulating concentrations of vitamin D and risk of lung cancer: an analysis in 20 prospective studies in the Lung Cancer Cohort Consortium (LC3). *Annals of Oncology*. 2018 Jun;29(6):1468–75.
253. Helzlsouer KJ. Overview of the Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers. *Am J Epidemiol*. 2010 Jul 1;172(1):4–9.
254. Gaksch M, Jorde R, Grimnes G, Joakimsen R, Schirmer H, Wilsgaard T, et al. Vitamin D and mortality: Individual participant data meta-analysis of standardized 25-hydroxyvitamin D in 26916 individuals from a European consortium. *PLoS One*. 2017 Feb 16;12(2): e0170791.
255. Han J, Guo X, Yu X, Liu S, Cui X, Zhang B, et al. 25-Hydroxyvitamin D and Total Cancer Incidence and Mortality: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Nutrients*. 2019 Sep 26;11(10):2295.
256. Chowdhury R, Kunutsor S, Vitezova A, Oliver-Williams C, Chowdhury S, Kieftede-Jong JC, et al. Vitamin D and risk of cause specific death: systematic review and meta-analysis of observational cohort and randomised intervention studies. *BMJ*. 2014 Apr 1;348(apr01 2): g1903–g1903.
257. Yin L, Ordóñez-Mena JM, Chen T, Schöttker B, Arndt V, Brenner H. Circulating 25-hydroxyvitamin D serum concentration and total cancer incidence and mortality: A systematic review and meta-analysis. *Prev Med (Baltim)*. 2013 Dec;57(6):753–64.

258. Sluyter JD, Manson JE, Scragg R. Vitamin D and Clinical Cancer Outcomes: A Review of Meta-Analyses. *JBMR Plus*. 2021 Jan 4;5(1).
259. Scragg R. Emerging Evidence of Thresholds for Beneficial Effects from Vitamin D Supplementation. *Nutrients*. 2018 May 3;10(5):561.
260. Goodwill AM, Szoeki C. A Systematic Review and Meta-Analysis of The Effect of Low Vitamin D on Cognition. *J Am Geriatr Soc*. 2017 Oct 31;65(10):2161–8.
261. Laiteerapong N, Huang ES. Chapter 16: Diabetes in Older Adults. In: *Diabetes in America* 3rd edition [Internet]. 2018 [cited 2024 Apr 2]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567980/>
262. Formiga F, Gómez-Huelgas R, Rodríguez Mañas L. Características diferenciales de la diabetes mellitus tipo 2 en el paciente anciano. Papel de los inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2016 Jan;51(1):44–51.
263. Al-Sofiani ME, Ganji SS, Kalyani RR. Body composition changes in diabetes and aging. *J Diabetes Complications*. 2019 Jun;33(6):451–9.
264. Mastrototaro L, Roden M. Insulin resistance and insulin sensitizing agents. *Metabolism*. 2021 Dec; 125:154892.
265. Tucker LA. Insulin Resistance and Biological Aging: The Role of Body Mass, Waist Circumference, and Inflammation. *Biomed Res Int*. 2022 May 9; 2022:1–8.
266. Yang H, Gong R, Liu M, Deng Y, Zheng X, Hu T. HOMA-IR is positively correlated with biological age and advanced aging in the US adult population. *Eur J Med Res*. 2023 Oct 28;28(1):470.
267. Corriere M, Rooparinesingh N, Kalyani RR. Epidemiology of Diabetes and Diabetes Complications in the Elderly: An Emerging Public Health Burden. *Curr Diab Rep*. 2013 Dec 11;13(6):805–13.

268. Yanar K, Simsek B, Çakatay U. Integration of Melatonin Related Redox Homeostasis, Aging, and Circadian Rhythm. *Rejuvenation Res.* 2019 Oct 1;22(5):409–19.
269. Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol.* 1991 Aug;79(1–3):C153–8.
270. Sharafati-Chaleshtori R, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M, Soltani A. Melatonin and human mitochondrial diseases. *Journal of Research in Medical Sciences.* 2017;22(1):2.
271. Martín Giménez VM, de las Heras N, Lahera V, Tresguerres JAF, Reiter RJ, Manucha W. Melatonin as an Anti-Aging Therapy for Age-Related Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci.* 2022 Jun 3;14.
272. Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G, Edwards B. Jet lag: trends and coping strategies. *The Lancet.* 2007 Mar;369(9567):1117–29.
273. Ko JW, Shin NR, Jung TY, Shin IS, Moon C, Kim SH, et al. Melatonin attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in rats via induction of anti-aging protein, Klotho. *Food and Chemical Toxicology.* 2019 Jul; 129:201–10.
274. Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Yang Y, Aranda-Martínez P, Martínez-Ruiz L, Escames G, et al. From Chronodisruption to Sarcopenia: The Therapeutic Potential of Melatonin. *Biomolecules.* 2023 Dec 12;13(12):1779.
275. Walford RL. Auto-immunity and Aging. *J Gerontol.* 1962 Jul 1;17(3):281–5.
276. Singhal SK RJDAK. Suppressor cells in immunosenescence. *Fed Proc.* 1978;37(5):1245–52.
277. Pawelec G. Age and immunity: What is “immunosenescence”? *Exp Gerontol.* 2018 May; 105:4–9.

278. Guan Y, Zhang C, Lyu G, Huang X, Zhang X, Zhuang T, et al. Senescence-activated enhancer landscape orchestrates the senescence-associated secretory phenotype in murine fibroblasts. *Nucleic Acids Res.* 2020 Nov 4;48(19):10909–23.
279. Fali T, Papagno L, Bayard C, Mouloud Y, Boddaert J, Sauce D, et al. New Insights into Lymphocyte Differentiation and Aging from Telomere Length and Telomerase Activity Measurements. *The Journal of Immunology.* 2019 Apr 1;202(7):1962–9.
280. Aubert G, Baerlocher GM, Vulto I, Poon SS, Lansdorp PM. Collapse of Telomere Homeostasis in Hematopoietic Cells Caused by Heterozygous Mutations in Telomerase Genes. *PLoS Genet.* 2012 May 17;8(5): e1002696.
281. Lin J, Epel E, Cheon J, Kroenke C, Sinclair E, Bigos M, et al. Analyses and comparisons of telomerase activity and telomere length in human T and B cells: Insights for epidemiology of telomere maintenance. *J Immunol Methods.* 2010 Jan;352(1–2):71–80.
282. Li PH, Zhang R, Cheng LQ, Liu JJ, Chen HZ. Metabolic regulation of immune cells in proinflammatory microenvironments and diseases during ageing. *Ageing Res Rev.* 2020 Dec; 64:101165.
283. Imai S ichiro. The NAD World 2.0: the importance of the inter-tissue communication mediated by NAMPT/NAD⁺/SIRT1 in mammalian aging and longevity control. *NPJ Syst Biol Appl.* 2016 Aug 18;2(1):16018.
284. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians. *PLoS One.* 2010 May 17;5(5): e10667.

285. Müller L, Di Benedetto S, Pawelec G. The Immune System and Its Dysregulation with Aging. In 2019. p. 21–43.
286. Salminen A. Immunosuppressive network promotes immunosenescence associated with aging and chronic inflammatory conditions. *J Mol Med*. 2021 Nov 25;99(11):1553–69.
287. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AKL, Flavell RA. TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β REGULATION OF IMMUNE RESPONSES. *Annu Rev Immunol*. 2006 Apr 1;24(1):99–146.
288. Fulop T, Dupuis G, Baehl S, Le Page A, Bourgade K, Frost E, et al. From inflamm-aging to immune-paralysis: a slippery slope during aging for immune-adaptation. *Biogerontology*. 2016 Feb 15;17(1):147–57.
289. Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB. High TNF- α levels in resting B cells negatively correlate with their response. *Exp Gerontol*. 2014 Jun; 54:116–22.
290. Yamashita M, Iwama A. Aging and Clonal Behavior of Hematopoietic Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 9;23(4):1948.
291. Pang WW, Price EA, Sahoo D, Beerman I, Maloney WJ, Rossi DJ, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011 Dec 13;108(50):20012–7.
292. Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA. Distinct Hematopoietic Stem Cell Subtypes Are Differentially Regulated by TGF- β 1. *Cell Stem Cell*. 2010 Mar;6(3):265–78.
293. Kogut I, Scholz JL, Cancro MP, Cambier JC. B cell maintenance and function in aging. *Semin Immunol*. 2012 Oct;24(5):342–9.

294. Cho RH, Sieburg HB, Muller-Sieburg CE. A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5553–61.
295. Stephan RP, Reilly CR, Witte PL. Impaired Ability of Bone Marrow Stromal Cells to Support B-Lymphopoiesis With Age. *Blood*. 1998 Jan 1;91(1):75–88.
296. Kyoizumi S, Kubo Y, Kajimura J, Yoshida K, Imai K, Hayashi T, et al. Age-Associated Changes in the Differentiation Potentials of Human Circulating Hematopoietic Progenitors to T- or NK-Lineage Cells. *The Journal of Immunology*. 2013 Jun 15;190(12):6164–72.
297. Wang CQ, Udupa KB, Xiao H, Lipschitz DA. Effect of age on marrow macrophage number and function. *Aging Clin Exp Res*. 1995 Oct 2;7(5):379–84.
298. Frasca D, Diaz A, Romero M, Garcia D, Blomberg BB. B Cell Immunosenescence. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2020 Oct 6;36(1):551–74.
299. Coder BD, Wang H, Ruan L, Su DM. Thymic Involution Perturbs Negative Selection Leading to Autoreactive T Cells That Induce Chronic Inflammation. *The Journal of Immunology*. 2015 Jun 15;194(12):5825–37.
300. Rezzani R, Nardo L, Favero G, Peroni M, Rodella LF. Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview. *Age (Omaha)*. 2014 Feb 23;36(1):313–51.
301. Czesnikiewicz-Guzik M, Lee WW, Cui D, Hiruma Y, Lamar DL, Yang ZZ, et al. T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clinical Immunology*. 2008 Apr;127(1):107–18.
302. Park J, Miyakawa T, Shiokawa A, Nakajima-Adachi H, Tanokura M, Hachimura S. Splenic Stromal Cells from Aged Mice Produce Higher Levels of IL-6 Compared to Young Mice. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014:1–9.

303. Thompson HL, Smithey MJ, Surh CD, Nikolich-Zugich J. Functional and Homeostatic Impact of Age-Related Changes in Lymph Node Stroma. *Front Immunol*. 2017 Jun 14;8.
304. Turner VM, Mabbott NA. Structural and functional changes to lymph nodes in ageing mice. *Immunology*. 2017 Jun 16;151(2):239–47.
305. Briceño O, Lissina A, Wanke K, Afonso G, Braun A, Ragon K, et al. Reduced naïve CD8(+) T-cell priming efficacy in elderly adults. *Aging Cell* [Internet]. 2016 Feb 15;15(1):14–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/acel.12384>
306. Budamagunta V, Foster TC, Zhou D. Cellular senescence in lymphoid organs and immunosenescence. *Aging*. 2021 Aug 15;13(15):19920–41.
307. Warner HR. The Future of Aging Interventions: Current Status of Efforts to Measure and Modulate the Biological Rate of Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59(7): B692–6.
308. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004 Dec 7;101(49):17312–5.
309. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, Richards JB, Gardner JP, Surdulescu GL, et al. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. *Arch Intern Med*. 2008 Jan;168(2):154–8.
310. Valdes A, Andrew T, Gardner J, Kimura M, Oelsner E, Cherkas L, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *The Lancet*. 2005 Aug;366(9486):662–4.

311. Nordfjäll K, Eliasson M, Stegmayr B, Melander O, Nilsson P, Roos G. Telomere Length Is Associated With Obesity Parameters but With a Gender Difference. *Obesity*. 2008 Dec 6;16(12):2682–9.
312. Cherkas LF, Aviv A, Valdes AM, Hunkin JL, Gardner JP, Surdulescu GL, et al. The effects of social status on biological aging as measured by white-blood-cell telomere length. *Aging Cell*. 2006 Oct 18;5(5):361–5.
313. 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 May;91(5):1273–80.
314. Nettleton JA, Diez-Roux A, Jenny NS, Fitzpatrick AL, Jacobs DR. Dietary patterns, food groups, and telomere length in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) 3 [Internet]. 2008. Available from: <http://www.mesa-nhlbi.org>.
315. Quach A, Levine ME, Tanaka T, Lu AT, Chen BH, Ferrucci L, et al. Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors. *Aging*. 2017 Feb 14;9(2):419–46.
316. Kaczmarczyk MM, Miller MJ, Freund GG. The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabolism*. 2012 Aug;61(8):1058–66.
317. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2002 Nov 19;106(21):2747–57.
318. van't Veer P, Jansen MC, Klerk M, Kok FJ. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr*. 2000 Mar 2;3(1):103–7.

319. Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. The Effects of Diet on Inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Aug;48(4):677–85.
320. Orenduff MC, Coleman MF, Glenny EM, Huffman KM, Rezeli ET, Bareja A, et al. Differential effects of calorie restriction and rapamycin on age-related molecular and functional changes in skeletal muscle. *Exp Gerontol*. 2022 Aug; 165:111841.
321. Redman LM, Ravussin E. Caloric Restriction in Humans: Impact on Physiological, Psychological, and Behavioral Outcomes. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jan 15;14(2):275–87.
322. Varady KA. Intermittent versus daily calorie restriction: which diet regimen is more effective for weight loss? *Obesity Reviews*. 2011 Jul 17;12(7).
323. Shabkhizan R, Haiaty S, Moslehian MS, Bazmani A, Sadeghsoltani F, Saghaei Bagheri H, et al. The Beneficial and Adverse Effects of Autophagic Response to Caloric Restriction and Fasting. *Advances in Nutrition*. 2023 Sep;14(5):1211–25.
324. Canicoba M. Aplicaciones clínicas del ayuno intermitente. *Revista de Nutrición Clínica y Metabolismo*. 2020 Oct 15;3(2):87–94.
325. Khalafi M, Symonds ME, Maleki AH, Sakhaei MH, Ehsanifar M, Rosenkranz SK. Combined versus independent effects of exercise training and intermittent fasting on body composition and cardiometabolic health in adults: a systematic review and meta-analysis. *Nutr J*. 2024 Jan 6;23(1):7.
326. Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. The Molecular Inflammatory Process in Aging. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Mar;8(3–4):572–81.
327. Zou Y, Jung KJ, Kim JW, Yu BP, Chung HY. Alteration of soluble adhesion molecules during aging and their modulation by calorie restriction. *The FASEB Journal*. 2004 Feb 19;18(2):320–2.

328. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microsc Res Tech*. 2002 Nov 15;59(4):264–72.
329. Yang F, Liu C, Liu X, Pan X, Li X, Tian L, et al. Effect of Epidemic Intermittent Fasting on Cardiometabolic Risk Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Nutr*. 2021 Oct 18;8.
330. Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S. Biological Age Predictors. *EBioMedicine*. 2017 Jul; 21:29–36.
331. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet*. 2018 Jun;19(6):371–84.
332. Li A, Koch Z, Ideker T. Epigenetic aging: Biological age prediction and informing a mechanistic theory of aging. *J Intern Med*. 2022 Nov 20;292(5):733–44.
333. Wang C, Ni W, Yao Y, Just A, Heiss J, Wei Y, et al. DNA methylation-based biomarkers of age acceleration and all-cause death, myocardial infarction, stroke, and cancer in two cohorts: The NAS, and KORA F4. *EBioMedicine*. 2021 Jan; 63:103151.
334. Lu AT, Quach A, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Raj K, et al. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging*. 2019 Jan 21;11(2):303–27.
335. Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*. 2018 Apr 18;10(4):573–91.
336. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013;14(10): R115.

337. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell*. 2013 Jan;49(2):359–67.
338. Horvath S, Oshima J, Martin GM, Lu AT, Quach A, Cohen H, et al. Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies. *Aging*. 2018 Jul 26;10(7):1758–75.
339. Kong L, Ye C, Wang Y, Hou T, Zheng J, Zhao Z, et al. Genetic Evidence for Causal Effects of Socioeconomic, Lifestyle, and Cardiometabolic Factors on Epigenetic-Age Acceleration. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2023 Jul 8;78(7):1083–91.
340. Figgins E, Pieruccini-Faria F, Speechley M, Montero-Odasso M. Potentially modifiable risk factors for slow gait in community-dwelling older adults: A systematic review. *Ageing Res Rev*. 2021 Mar; 66:101253.
341. Wang Y, Ye C, Kong L, Zheng J, Xu M, Xu Y, et al. Independent Associations of Education, Intelligence, and Cognition with Hypertension and the Mediating Effects of Cardiometabolic Risk Factors: A Mendelian Randomization Study. *Hypertension*. 2023 Jan 1;80(1):192–203.
342. Bountziouka V, Musicha C, Allara E, Kaptoge S, Wang Q, Angelantonio E Di, et al. Modifiable traits, healthy behaviours, and leukocyte telomere length: a population-based study in UK Biobank. *Lancet Healthy Longev*. 2022 May;3(5):e321–31.
343. Bronnum-Hansen H. Abstention from smoking extends life and compresses morbidity: a population-based study of health expectancy among smokers and never smokers in Denmark. *Tob Control*. 2001 Sep 1;10(3):273–8.

344. Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens—Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol*. 2009 Nov;10(11):1033–4.
345. Goldberg IJ, Mosca L, Piano MR, Fisher EA. Wine and Your Heart. *Circulation*. 2001 Jan 23;103(3):472–5.
346. Larsson SC, Burgess S, Mason AM, Michaëlsson K. Alcohol Consumption and Cardiovascular Disease. *Circ Genom Precis Med*. 2020 Jun;13(3).
347. Griswold MG, Fullman N, Hawley C, Arian N, Zimsen SRM, Tymeson HD, et al. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*. 2018 Sep;392(10152):1015–35.
348. Stockwell T, Zhao J, Panwar S, Roemer A, Naimi T, Chikritzhs T. Do “Moderate” Drinkers Have Reduced Mortality Risk? A Systematic Review and Meta-Analysis of Alcohol Consumption and All-Cause Mortality. *J Stud Alcohol Drugs*. 2016 Mar;77(2):185–98.
349. Wang M, Li Y, Lai M, Nannini DR, Hou L, Joehanes R, et al. Alcohol consumption and epigenetic age acceleration across human adulthood. *Aging*. 2023 Oct 26;
350. Nannini DR, Joyce BT, Zheng Y, Gao T, Wang J, Liu L, et al. Alcohol consumption and epigenetic age acceleration in young adults. *Aging*. 2023 Jan 5;15(2):371–95.
351. Eckstrom E, Neukam S, Kalin L, Wright J. Physical Activity and Healthy Aging. *Clin Geriatr Med*. 2020 Nov;36(4):671–83.
352. Glynn NW, Hall KS. Insights Into The Key Role Of Physical Activity And Exercise On Successful Aging In Older Adults. *Innov Aging*. 2017 Jul 1;1(suppl_1):1353–1353.

353. Rogers NT, Marshall A, Roberts CH, Demakakos P, Steptoe A, Scholes S. Physical activity and trajectories of frailty among older adults: Evidence from the English Longitudinal Study of Ageing. *PLoS One*. 2017 Feb 2;12(2): e0170878.
354. Pabianek Ł, Żołądkiewicz K, Brzezińska P. Physical activity during aging – role of physical activity in muscle atrophy and physical impairment during aging. *Quality in Sport*. 2020 Aug 11;6(3):42–54.
355. Han M, Fang J, Zhang Y, Song X, Jin L, Ma Y. Associations of sleeping, sedentary and physical activity with phenotypic age acceleration: a cross-sectional isotemporal substitution model. *BMC Geriatr*. 2023 Mar 23;23(1):165.
356. Han KT, Kim D, Kim S. Is Sleep Duration Associated with Biological Age (BA)? Analysis of (2010–2015) South Korean NHANES Dataset South Korea. *Int J Environ Res Public Health*. 2018 Sep 14;15(9):2009.
357. Gkatzamanis V, Panagiotakos DB, Yannakoulia M, Mary K, Dardiotis E, Hadjigeorgiou G, et al. Sleep Quality and Duration as Determinants of Healthy Aging Trajectories: The HELIAD Study. *J Frailty Aging*. 2022;
358. Wu D, Qu C, Huang P, Geng X, Zhang J, Shen Y, et al. Better Life's Essential 8 contributes to slowing the biological aging process: a cross-sectional study based on NHANES 2007–2010 data. *Front Public Health*. 2024 Mar 13;12.
359. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997 Nov 6;390(6655):45–51.
360. Xu Y, Sun Z. Molecular Basis of Klotho: From Gene to Function in Aging. *Endocr Rev*. 2015 Apr 1;36(2):174–93.

361. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V., Nandi A, Gurnani P, et al. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. *Science* (1979). 2005 Sep 16;309(5742):1829–33.
362. Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, Nakagawa S, Sekine S, Fujimori T, et al. Molecular cloning and expression analyses of mouse β Klotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mech Dev*. 2000;98(1):115–119.
363. Ito S, Fujimori T, Hayashizaki Y, Nabeshima Y. Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 2002 Jul;1576(3):341–5.
364. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, et al. Regulation of Fibroblast Growth Factor-23 Signaling by Klotho. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Mar;281(10):6120–3.
365. Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Goetz R, et al. β Klotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(18):7432–7.
366. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, et al. Tissue-specific expression of β Klotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem*. 2007;282(37):26687–95.
367. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, et al. Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Molecular Endocrinology*. 2010 Oct 1;24(10):2050–64.

368. Duce JA, Podvin S, Hollander W, Kipling D, Rosene DL, Abraham CR. Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey. *Glia*. 2008 Jan 26;56(1):106–17.
369. Chen CD, Sloane JA, Li H, Aytan N, Giannaris EL, Zeldich E, et al. The Antiaging Protein Klotho Enhances Oligodendrocyte Maturation and Myelination of the CNS. *The Journal of Neuroscience*. 2013 Jan 30;33(5):1927–39.
370. Zeldich E, Chen CD, Avila R, Medicetty S, Abraham CR. The Anti-Aging Protein Klotho Enhances Remyelination Following Cuprizone-Induced Demyelination. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2015 Oct 12;57(2):185–96.
371. Zeldich E, Chen CD, Boden E, Howat B, Nasse JS, Zeldich D, et al. Klotho Is Neuroprotective in the Superoxide Dismutase (SOD1G93A) Mouse Model of ALS. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2019 Oct 27;69(2):264–85.
372. Zeldich E, Chen CD, Colvin TA, Bove-Fenderson EA, Liang J, Tucker Zhou TB, et al. The Neuroprotective Effect of Klotho is Mediated via Regulation of Members of the Redox System. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Aug;289(35):24700–15.
373. Dubal DB, Yokoyama JS, Zhu L, Broestl L, Worden K, Wang D, et al. Life Extension Factor Klotho Enhances Cognition. *Cell Rep*. 2014;
374. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jul;398(3):513–8.
375. Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H, et al. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein 1. *FEBS Lett*. 1998 Mar 6;424(1–2):6–10.

376. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y ichi. Identification of the HumanKlothoGene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and SecretedKlothoProtein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jan;242(3):626–30.
377. Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 Dec 11;104(50):19796–801.
378. Chen CD, Li Y, Chen AK, Rudy MA, Nasse JS, Zeldich E, et al. Identification of the cleavage sites leading to the shed forms of human and mouse anti-aging and cognition-enhancing protein Klotho. *PLoS One*. 15(1).
379. Bloch L, Sineshchekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-o M, et al. Klotho is a substrate for α -, β - and γ -secretase. *FEBS Lett*. 2009 Oct 6;583(19):3221–4.
380. Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*. 1997 Oct;7(5):637–44.
381. Kuro-o M. Klotho in health and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012 Jul;21(4):362–8.
382. Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, et al. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene*. 2008 Nov 27;27(56):7094–105.
383. Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V., Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, et al. Regulation of Oxidative Stress by the Anti-aging Hormone Klotho*♦. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Nov;280(45):38029–34.

384. Kuro-o M. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Jan 19;15(1):27–44.
385. Dalton GD, Xie J, An SW, Huang CL. New Insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017 Nov 17; 8:323.
386. Ray A, Alalem M, Ray BK. Insulin signaling network in cancer. *Indian J Biochem Biophys.* 51(6):493–498.
387. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jul;4(7):505–18.
388. Kops GJPL, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KWA, Coffey PJ, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature.* 2002 Sep;419(6904):316–21.
389. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, et al. Extension of Murine Life Span by Overexpression of Catalase Targeted to Mitochondria. *Science (1979).* 2005 Jun 24;308(5730):1909–11.
390. Banerjee S, Zhao Y, Sarkar PS, Rosenblatt KP, Tilton RG, Choudhary S. Klotho Ameliorates Chemically Induced Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2013;31(4–5):659–72.
391. Mytych J, Solek P, Kozirowski M. Klotho modulates ER-mediated signaling crosstalk between prosurvival autophagy and apoptotic cell death during LPS challenge. *Apoptosis.* 2019 Feb 24;24(1–2):95–107.
392. King GD, Rosene DL, Abraham CR. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. *Age (Omaha).* 2012 Dec 16;34(6):1405–19.

393. Lee J, Jeong DJ, Kim J, Lee S, Park JH, Chang B, et al. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer*. 2010;9(1):109.
394. Pan J, Zhong J, Gan LH, Chen SJ, Jin HC, Wang X, et al. Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumor Biology*. 2011 Aug 27;32(4):729–35.
395. Kuro-o M. Klotho and calciprotein particles as therapeutic targets against accelerated ageing. *Clin Sci*. 2021 Aug 13;135(15):1915–27.
396. Vitality C, Foundation ADD. Cognitive vitality reports: Klotho. 2018;
397. Shardell M, Semba RD, Kalyani RR, Bandinelli S, Prather AA, Chia CW, et al. Plasma Klotho and Frailty in Older Adults: Findings From the InCHIANTI Study. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2019 Jun 18;74(7):1052–7.
398. Behringer V, Stevens JMG, Deschner T, Sonnweber R, Hohmann G. Aging and sex affect soluble alpha klotho levels in bonobos and chimpanzees. *Front Zool*. 2018 Dec 19;15(1):35.
399. Semba RD, Moghekar AR, Hu J, Sun K, Turner R, Ferrucci L, et al. Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer’s disease. *Neurosci Lett*. 2014 Jan; 558:37–40.
400. Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec*. 1992 Feb 26;232(2):194–201.
401. Weinstein JR, Anderson S. The Aging Kidney: Physiological Changes. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010 Jul;17(4):302–7.
402. Kaplan C, Pasternack B, Shah H, Gallo G. Age-related incidence of sclerotic glomeruli in human kidneys. *Am J Pathol*. 1975;80(2):227–234.

403. Azuma M, Koyama D, Kikuchi J, Yoshizawa H, Thasinas D, Shiizaki K, et al. Promoter methylation confers kidney-specific expression of the Klotho gene. *The FASEB Journal*. 2012 Oct 10;26(10):4264–74.
404. Wang H, Xu J, Lazarovici P, Quirion R, Zheng W. cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Front Mol Neurosci*. 2018 Aug 30;11.
405. Lu X, Hu MC. Klotho/FGF23 Axis in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease. *Kidney Diseases*. 2017;3(1):15–23.
406. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Nov 1;121(11):4393–408.
407. Zhou L, Mo H, Miao J, Zhou D, Tan RJ, Hou FF, et al. Klotho Ameliorates Kidney Injury and Fibrosis and Normalizes Blood Pressure by Targeting the Renin-Angiotensin System. *Am J Pathol*. 2015 Dec;185(12):3211–23.
408. Stern S, Behar S, Gottlieb S. Aging and Diseases of the Heart. *Circulation*. 2003 Oct 7;108(14):99–101.
409. Marçais C, Maucort-Boulch D, Draï J, Dantony E, Carlier MC, Blond E, et al. Circulating Klotho Associates With Cardiovascular Morbidity and Mortality During Hemodialysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Sep 1;102(9):3154–61.
410. Xie J, Cha SK, An SW, Kuro-o M, Birnbaumer L, Huang CL. Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. *Nat Commun*. 2012 Dec 4;3(1):1238.
411. Sun X, Chen L, He Y, Zheng L. Circulating α -Klotho Levels in Relation to Cardiovascular Diseases: A Mendelian Randomization Study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Feb 7; 13:842846.

412. Kovacs E, Lowery E, Kuhlmann E, Brubaker A. The aging lung. *Clin Interv Aging*. 2013 Nov;8(1):1489.
413. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (The BOLD Study): a population-based prevalence study. *The Lancet*. 2007 Sep;370(9589):741–50.
414. Batlahally S, Franklin A, Damianos A, Huang J, Chen P, Sharma M, et al. Soluble Klotho, a biomarker and therapeutic strategy to reduce bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension in preterm infants. *Sci Rep*. 2020 Jul 23;10(1):12368.
415. Huang Q, Chen Y, Shen S, Wang Y, Liu L, Wu S, et al. Klotho antagonizes pulmonary fibrosis through suppressing pulmonary fibroblasts activation, migration, and extracellular matrix production: a therapeutic implication for idiopathic pulmonary fibrosis. *Aging*. 2020 Apr 3;12(7):5812–31.
416. van den Beld AW, Kaufman JM, Zillikens MC, Lamberts SWJ, Egan JM, van der Lely AJ. The physiology of endocrine systems with ageing. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018 Aug;6(8):647–58.
417. Kirkman MS, Briscoe VJ, Clark N, Florez H, Haas LB, Halter JB, et al. Diabetes in Older Adults. *Diabetes Care*. 2012 Dec 1;35(12):2650–64.
418. Lan T, Morgan DA, Rahmouni K, Sonoda J, Fu X, Burgess SC, et al. FGF19, FGF21, and an FGFR1/β-Klotho-Activating Antibody Act on the Nervous System to Regulate Body Weight and Glycemia. *Cell Metab*. 2017 Nov;26(5):709-718.e3.
419. BonDurant LD, Ameka M, Naber MC, Markan KR, Idiga SO, Acevedo MR, et al. FGF21 Regulates Metabolism Through Adipose-Dependent and -Independent Mechanisms. *Cell Metab*. 2017 Apr;25(4):935-944.e4.

420. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. 6(1):1–6.
421. Chen CD, Li H, Liang J, Hixson K, Zeldich E, Abraham CR. The Anti-Aging and Tumor Suppressor Protein Klotho Enhances Differentiation of a Human Oligodendrocytic Hybrid Cell Line. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2015 Jan 8;55(1):76–90.
422. Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. Xie J, Cha SK, An SW, Kuro-o M, editors. *Nature*. 2016 Nov 9;539(7628):180–6.
423. Massó A, Sánchez A, Gimenez-Llort L, Lizcano JM, Cañete M, García B, et al. Secreted and Transmembrane α Klotho Isoforms Have Different Spatio-Temporal Profiles in the Brain during Aging and Alzheimer’s Disease Progression. Blum D, editor. *PLoS One*. 2015 Nov 24;10(11): e0143623.
424. Sancesario GM, Di Lazzaro G, Grillo P, Biticchi B, Giannella E, Alwardat M, et al. Biofluids profile of α -Klotho in patients with Parkinson’s disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2021 Sep; 90:62–4.
425. Sian J, Youdim MBH, Riederer P, Gerlach M. MPTP-induced Parkinsonian syndrome. *Basic Neurochem Mol Cell Med Asp*. 1999;(Ed. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27974/>>).
426. Brobey RK, German D, Sonsalla PK, Gurnani P, Pastor J, Hsieh CC, et al. Klotho Protects Dopaminergic Neuron Oxidant-Induced Degeneration by Modulating ASK1 and p38 MAPK Signaling Pathways. Paudel HK, editor. *PLoS One*. 2015 Oct 9;10(10): e0139914.

427. Baluchnejadmojarad T, Eftekhari SM, Jamali-Raeufy N, Haghani S, Zeinali H, Roghani M. The anti-aging protein klotho alleviates injury of nigrostriatal dopaminergic pathway in 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease: Involvement of PKA/CaMKII/CREB signaling. *Exp Gerontol.* 2017 Dec; 100:70–6.
428. Abramovitz L, Rubinek T, Ligumsky H, Bose S, Barshack I, Avivi C, et al. KL1 Internal Repeat Mediates Klotho Tumor Suppressor Activities and Inhibits bFGF and IGF-I Signaling in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2011 Jul 1;17(13):4254–66.
429. Arbel Rubinstein T, Reuveni I, Hesin A, Klein-Goldberg A, Olauson H, Larsson TE, et al. A Transgenic Model Reveals the Role of Klotho in Pancreatic Cancer Development and Paves the Way for New Klotho-Based Therapy. *Cancers (Basel).* 2021 Dec 15;13(24):6297.
430. Forsberg EA, Olauson H, Larsson T, Catrina SB. Effect of systemically increasing human full-length Klotho on glucose metabolism in db/db mice. *Diabetes Res Clin Pract.* 113:208–210.
431. Hu MC, Moe OW. Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 8:423–429.
432. Hu MC. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int.* 78:1240–1251.
433. Neyra JA, Hu MC. Potential application of klotho in human chronic kidney disease. *Bone.* 100:41–49.
434. Tang X. Klotho: A tumor suppressor and modulator of the Wnt/ β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 96:197–205.

435. Yang YL. Long noncoding RNA NEAT1 is involved in the protective effect of Klotho on renal tubular epithelial cells in diabetic kidney disease through the ERK1/2 signaling pathway. *Exp Mol Med.* 52:266–280.
436. Lin Y, Sun Z. In vivo pancreatic β -cell-specific expression of antiaging gene Klotho: A novel approach for preserving β -cells in type 2 diabetes. *Diabetes.* 64(1444–1458):10 2337 14–0632.
437. Kuro-o M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biological Chemistry.* 2008.
438. Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat Cell Biol.* 2011 Mar 20;13(3):254–62.
439. Takenaka T. Klotho protein supplementation reduces blood pressure and renal hypertrophy in db/db mice, a model of type 2 diabetes. *Acta Physiol. Oxford, England;*
440. Hui H. Klotho suppresses the inflammatory responses and ameliorates cardiac dysfunction in aging endotoxemic mice. *Oncotarget.* 8:15663–15676.
441. Percy CJ, Power D, Gobe GC. Renal ageing: Changes in the cellular mechanism of energy metabolism and oxidant handling. *Nephrology (Carlton.* 13:147–152.
442. Ravikumar P. α -Klotho protects against oxidative damage in pulmonary epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 307: L566–5.
443. Takenaka T. Klotho supplementation ameliorates blood pressure and renal function in DBA/2-*pcy* mice, a model of polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 318: F557–f.
444. Zhang H. Klotho is a target gene of PPAR- γ . *Kidney Int.* 74:732–739.

445. Spangenburg EE, Brown DA, Johnson MS, Moore RL. Alterations in peroxisome proliferator-activated receptor mRNA expression in skeletal muscle after acute and repeated bouts of exercise. *Mol Cell Biochem.* 332:225–231.
446. Farzanegi P, Dana A, Ebrahimpoor Z, Asadi M, Azarbayjani MA. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. *Eur J Sport Sci.* 19:994–1003.
447. Thomas AW. Exercise-associated generation of PPAR γ ligands activates PPAR γ signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism. *J Appl Physiol.* 112:806–815.
448. Avin KG, Coen PM, Huang W, Stolz DB, Sowa GA, Dubé JJ, et al. Skeletal muscle as a regulator of the longevity protein, Klotho. *Front Physiol.* 2014 Jun 17; 5:1–9.
449. Colaianni G, Cinti S, Colucci S, Grano M. Irisin and musculoskeletal health. *Ann N Y Acad Sci.* 1402:5–9.
450. Safdar A, Saleem A, Tarnopolsky MA. The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 12:504–517.
451. Safdar A, Tarnopolsky MA. Exosomes as mediators of the systemic adaptations to endurance exercise. *Cold Spring Harbor Perspect Med.*
452. Lee TH. Potential exerkines for physical exercise-elicited pro-cognitive effects: Insight from clinical and animal research. *Int Rev Neurobiol.* 147:361–395.
453. Yu M, Tsai SF, Kuo YM. The therapeutic potential of anti-inflammatory exerkines in the treatment of atherosclerosis. *Int J Mol Sci.*
454. Hawley JA, Joyner MJ, Green DJ. Mimicking exercise: What matters most and where to next? *J Physiol.* 599:791–802.

455. Whitham M, Febbraio MA. The ever-expanding myokinome: Discovery challenges and therapeutic implications. *Nat Rev Drug Discov.* 15:719–729.
456. Corrêa H de L, Raab ATO, Araújo TM, Deus LA, Reis AL, Honorato FS, et al. A systematic review and meta-analysis demonstrating Klotho as an emerging exerkinome. *Sci Rep.* 2022 Oct;12(1):17587.
457. Amaro-Gahete FJ, de-la-O A, Jurado-Fasoli L, Ruiz JR, Castillo MJ, Gutiérrez Á. Role of Exercise on S-Klotho Protein Regulation: A Systematic Review. *Curr Aging Sci.* 2018;11(2):100–7.
458. Rosa TDS. Age-related decline in renal function is attenuated in master athletes. *Int J Sports Med.*
459. Rosa TS. Sprint and endurance training in relation to redox balance, inflammatory status and biomarkers of aging in master athletes. *Nitric Oxide Biol Chem.* 102:42–51.
460. Amaro-Gahete F, De la O A, Jurado Fasoli L, Espuch-Oliver A, de Haro T, Gutiérrez A, et al. Body Composition and S-Klotho Plasma Levels in Middle-Aged Adults: A Cross-Sectional Study. *Rejuvenation Research.* 2019.
461. Amaro-Gahete FJ, De-la OA, Jurado-Fasoli L, Ruiz JR C, M.J. Association of basal metabolic rate and fuel oxidation in basal conditions and during exercise, with plasma S-klotho: The FIT-AGEING study. *Aging.* 11:5319–5333.
462. Amaro-Gahete FJ. Association of physical activity and fitness with S-Klotho plasma levels in middle-aged sedentary adults: The FIT-AGEING study. *Maturitas.* 123:25–31.
463. Amaro-Gahete FJ. Relationship between plasma S-Klotho and cardiometabolic risk in sedentary adults. *Aging.* 12:2698–2710.

464. Crasto C, Semba R, Sun K. Relationship of low-circulating ‘anti-aging’ klotho hormone with disability in activities of daily living among older community-dwelling adults. *Rejuvenation Res.* 5:295–301.
465. Semba RD. Relationship of low plasma klotho with poor grip strength in older community-dwelling adults: The InCHIANTI study. *Eur J Appl Physiol.* 112:1215–1220.
466. Shardell M. Serum 25-hydroxyvitamin D, plasma Klotho, and lower-extremity physical performance among older adults: Findings from the InCHIANTI study. *J Gerontol Ser Biol Sci Med Sci.* 70:1156–1162.
467. Santos-Dias A. Longevity protein klotho is induced by a single bout of exercise. *Br J Sports Med.* 51:549–550.
468. Ost M, Coleman V, Kasch J, Klaus S. Regulation of myokine expression: Role of exercise and cellular stress. *Free Radic Biol Med.* 98:78–89.
469. Welc SS, Clanton TL. The regulation of interleukin-6 implicates skeletal muscle as an integrative stress sensor and endocrine organ. *Exp Physiol.* 98:359–371.
470. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 224:164–175.
471. Ji LL, Kang C, Zhang Y. Exercise-induced hormesis and skeletal muscle health. *Free Radic Biol Med.* 98:113–122.
472. Calabrese EJ, Iavicoli I, Hormesis C V. Its impact on medicine and health. *Hum Exp Toxicol.* 32:120–152.
473. Ebert T. Inflammation and premature ageing in chronic kidney disease. *Toxins (Basel).*
474. Izquierdo MC. Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 27(Suppl 4):6–10.

475. Agita A, Alsagaff MT. Inflammation, immunity, and hypertension. *Acta Med Indones.* 49:158–165.
476. Brunetta HS, Holwerda AM, Loon LJ, Exercise HGP. Mitochondrial ROS and aging: Understanding exercise as a preventive tool. *J Sci Sports Exerc.* 2:15–24.
477. M EA, J A, L RM. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic. Biol Med.* 65:380–401.
478. Lim K. α -Klotho expression in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 100: E1308–.
479. Papaconstantinou J. The role of signaling pathways of inflammation and oxidative stress in development of senescence and aging phenotypes in cardiovascular disease. *Cells.*
480. Kotoku K. Effect of exercise intensity on renal blood flow in patients with chronic kidney disease stage 2. *Clin Exp Nephrol.* 23:621–628.
481. Corrêa HL. Blood flow restriction training blunts chronic kidney disease progression in humans. *Med Sci Sports Exerc.* 53:249–257.
482. Neves RVP. Dynamic not isometric training blunts osteo-renal disease and improves the sclerostin/FGF23/Klotho axis in maintenance hemodialysis patients: A randomized clinical trial. *J Appl Physiol.* 130:508–516.
483. Boeselt T. Benefits of high-intensity exercise training to patients with chronic obstructive pulmonary disease: A controlled study. *Respir Int Rev Thorac Dis.* 93:301–310.
484. Burd NA. Muscle time under tension during resistance exercise stimulates differential muscle protein sub-fractional synthetic responses in men. *J Physiol.* 590:351–362.

485. Morton RW. Muscle fibre activation is unaffected by load and repetition duration when resistance exercise is performed to task failure. *J Physiol.* 597:4601–4613.
486. Amaro-Gahete FJ, De-la-O A, Jurado-Fasoli L, Espuch-Oliver A, de Haro T, Gutierrez A, et al. Exercise training increases the S-Klotho plasma levels in sedentary middle-aged adults: A randomised controlled trial. The FIT-AGEING study. *J Sports Sci.* 2019 Oct 2;37(19):2175–83.
487. Saghiv M, Goldhammer E, Radzishovski E. The impact of 12 weeks exercise training on circulating soluble-Klotho and pro-BNP in coronary artery disease patients. *J Cardiol Vasc Res.* 1:1–4.
488. Matsubara T, Miyaki A, Akazawa N, Choi Y, Ra SG, Tanahashi K, et al. Aerobic exercise training increases plasma Klotho levels and reduces arterial stiffness in postmenopausal women. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2014 Feb 1;306(3):H348–55.
489. Araneda OF, Contreras-Briceño F, Cavada G, Viscor G. Swimming versus running: Effects on exhaled breath condensate pro-oxidants and pH. *Eur J Appl Physiol.* 118:2319–2329.
490. Millet GP, Vleck VE, Bentley DJ. Physiological differences between cycling and running: Lessons from triathletes. *Sports Med.* Auckland, N.Z;
491. Vargas-Ortiz K. Aerobic training but no resistance training increases SIRT3 in skeletal muscle of sedentary obese male adolescents. *Eur J Sport Sci.* 18:226–234.
492. McGuire DK. A 30-year follow-up of the Dallas Bedrest and Training Study: I. Effect of age on the cardiovascular response to exercise. *Circulation.* 104:1350–1357.

493. Bullock GS. Methods matter: Clinical prediction models will benefit sports medicine practice, but only if they are properly developed and validated. *Br J Sports Med*.
494. Cook C. Predicting future physical injury in sports: It's a complicated dynamic system. *Br J Sports Med*. 50:1356–1357.
495. Kox LS, Kuijjer PP, Kerkhoffs GM, Maas M, Frings-Dresen MH. Prevalence, incidence and risk factors for overuse injuries of the wrist in young athletes: A systematic review. *Br J Sports Med*. 49:1189–1196.
496. Takeda H, Nakagawa T, Nakamura K, Engebretsen L. Prevention and management of knee osteoarthritis and knee cartilage injury in sports. *Br J Sports Med*. 45:304–309.
497. Ahrens HE, Huettemeister J, Schmidt M, Kaether C, Maltzahn J. Klotho expression is a prerequisite for proper muscle stem cell function and regeneration of skeletal muscle. *Skelet Muscle*. 8(20).
498. Gu Y, Ren K, Wang L, Yao Q. Loss of Klotho contributes to cartilage damage by derepression of canonical Wnt/ β -catenin signaling in osteoarthritis mice. *Aging*. 11:12793–12809.
499. Welc SS, Wehling-Henricks M, Kuro OM, Thomas KA, Tidball JG. Modulation of Klotho expression in injured muscle perturbs Wnt signalling and influences the rate of muscle growth. *Exp Physiol*. 105:132–147.
500. Siest G, Henny J, Gräsbeck R, Wilding P, Petitclerc C, Queraltó JM, et al. The theory of reference values: An unfinished symphony. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013.
501. Nutton V. *Ancient Medicine*. Routledge; 2013. (Ancient Medicine).

502. Bernard C. An introduction to the study of experimental medicine. Vol. 400. Courier Corporation; 1957.
503. Mitchell R. Francis Galton's Hereditary Genius, 1869 & 1892. BRANCH: Britain, Representation and Nineteenth-Century History. 2016 Jan 1;
504. F.R.S. KP. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. Philosophical Magazine Series 1. 1901; 2:559–72.
505. Fisher RA. XV. The Correlation between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. Transactions of the Royal Society of Edinburgh. 2012/07/06. 1919;52(2):399–433.
506. Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. Reference values: A review. Vet Clin Pathol. 2009;38(3):288–98.
507. Reed AH, Henry RJ, Mason WB. Influence of Statistical Method Used on the Resulting Estimate of Normal Range. Clin Chem. 1971 Apr 1;17(4):275–84.
508. Gräsbeck R, Siest G, Wilding P, Williams GZ, Whitehead TP. Provisional recommendation on the theory of reference values (1978). Part 1. The concept of reference values. Clin Chem. 1979 Aug;25(8):1506–8.
509. Queraltó JM, Ribo A, Cortes M, Domenech MV, Ferrer P, Fuentes J et al. Produccion y utilizacion de valores de referencia. Quím Clín. 1987;6(1):49–68.
510. Gary L. Horowitz Susan Altaie, PhD, James C. Boyd, MD et al. MD. EP28-A3c: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010;(October).
511. Solberg HE, Gräsbeck R. Reference Values. Adv Clin Chem. 1989 Jan 1;27(C):1–79.

512. Panteghini M. The Future of Laboratory Medicine: Understanding the New Pressures. *Clin Biochem Rev.* 2004;25(4):207.
513. Gauss CF. *Theoria Motus Corporum Coelestium in Sectionibus Conicis Solem Ambientium.* Frid. Perthes, Besser; 1809.
514. Martinez-Sanchez L, Marques-Garcia F, Ozarda Y, Blanco A, Brouwer N, Canalias F, et al. Big data and reference intervals: rationale, current practices, harmonization and standardization prerequisites and future perspectives of indirect determination of reference intervals using routine data. 2021;2(1):9–16.
515. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem.* 1994 Nov;40(11 Pt 1):1996–2005.
516. Simundic AM, Kackov S, Miler M, Fraser CG, Petersen PH. Terms and symbols used in studies on biological variation: the need for harmonization. Vol. 61, *Clinical chemistry.* England; 2015. p. 438–9.
517. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1989;27(5):409–37.
518. Díaz-Garzón J, Fernández-Calle P, Ricós C. Modelos para estimar la variación biológica y la interpretación de resultados seriados: bondades y limitaciones. *Advances in laboratory medicine.* 2020 Oct;1(3):20200017.
519. Alström T, Gräsbeck R, Hjelm M, Skandsen S. Recommendations concerning the collection of reference values in clinical chemistry and activity report by the Committee on Reference Values of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1975; 144:1–44.
520. Mondragón-Barrios L. [Informed consent: a dialogic praxis for the research]. *Rev Invest Clin.* 2009;61(1):73–82.

521. Solberg HE. IFCC. The theory of reference values Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clinica Chimica Acta*. 1984;137(1):95–114.
522. Harris EK, Boyd JC. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem*. 1990 Feb;36(2):265–70.
523. Dixon WJ. Processing Data for Outliers. *Biometrics*. 1953 Mar 10;9(1):74–89.
524. Tukey JW. Exploratory data analysis. Addison-Wesley series in behavioral sciences TA - TT -. Reading, Mass. SE - xvi, 688 pages : illustrations ; 25 cm: Addison-Wesley Pub. Co. Reading, Mass.; 1977.
525. Todd JC, Sanford AH, Davidsohn I, Henry JB, Todd JC. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 16th ed. /. Philadelphia: Saunders; 1979.
526. Navarro-García JA, Rueda A, Romero-García T, Aceves-Ripoll J, Rodríguez-Sánchez E, González-Lafuente L, et al. Enhanced Klotho availability protects against cardiac dysfunction induced by uraemic cardiomyopathy by regulating Ca²⁺ handling. *Br J Pharmacol*. 2020 Oct 15;177(20):4701–19.
527. Kuro-o M. Klotho and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2009 Oct;1790(10):1049–58.
528. Batlahally S, Franklin A, Damianos A, Huang J, Chen P, Sharma M, et al. Soluble Klotho, a biomarker and therapeutic strategy to reduce bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension in preterm infants. *Sci Rep*. 2020 Jul 23;10(1):12368.
529. Amaro-Gahete FJ, De-la-O A, Jurado-Fasoli L, Ruiz JR, Castillo MJ. Association of basal metabolic rate and fuel oxidation in basal conditions and during exercise, with plasma S-klotho: the FIT-AGEING study. *Aging [Internet]*. 2019 Aug

7;11(15):5319–33. Available from: <https://www.aging-us.com/lookup/doi/10.18632/aging.102100>

530. Amaro-Gahete FJ, Jurado-Fasoli L, Sanchez-Delgado G, García-Lario J V., Castillo MJ, Ruiz JR. Relationship between plasma S-Klotho and cardiometabolic risk in sedentary adults. *Aging [Internet]*. 2020 Jan 20;12(3):2698–710. Available from: <https://www.aging-us.com/lookup/doi/10.18632/aging.102771>
531. Woo HG, Chang Y, Ryu DR, Song TJ. Plasma Klotho concentration is associated with the presence, burden and progression of cerebral small vessel disease in patients with acute ischaemic stroke. *PLoS One*. 2019 Aug 9;14(8): e0220796.
532. Martín-Núñez E, Donate-Correa J, Ferri C, López-Castillo Á, Delgado-Molinos A, Hernández-Carballo C, et al. Association between serum levels of Klotho and inflammatory cytokines in cardiovascular disease: a case-control study. *Aging*. 2020 Jan 27;12(2):1952–64.
533. Dhayat NA, Pruijm M, Ponte B, Ackermann D, Leichtle AB, Devuyst O, et al. Parathyroid Hormone and Plasma Phosphate Are Predictors of Soluble α -Klotho Levels in Adults of European Descent. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Apr 1;105(4): e1135–43.
534. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. 2010 Jul;398(3):513–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X10012507>
535. Pedersen L, Pedersen SM, Brasen CL, Rasmussen LM. Soluble serum Klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays. *Clin Biochem*. 2013 Aug;46(12):1079–83.

536. Pedersen L, Pedersen S, Brasen C. Soluble serum Klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays. *Clin Biochem.* 46:1079–1083.
537. Hu MC, Bian A, Neyra J, Zhan M. Klotho, stem cells, and aging. *Clin Interv Aging.* 2015 Aug; 10:1233.
538. Yi SS. Disease predictability review using common biomarkers appearing in diabetic nephropathy and neurodegeneration of experimental animals. *Lab Anim Res.* 2022 Feb 7;38(1):3.
539. Avin KG, Coen PM, Huang W, Stolz DB, Sowa GA, Dubé JJ, et al. Skeletal muscle as a regulator of the longevity protein, Klotho. *Front Physiol* [Internet]. 2014 Jun 17; 5:1–9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00189/abstract>
540. Saghiv MS, Sira D Ben, Goldhammer E, Sagiv M. The effects of aerobic and anaerobic exercises on circulating soluble-Klotho and IGF-I in young and elderly adults and in CAD patients. *J Circ Biomark* [Internet]. 2017 Sep 28; 6:1849454417733388. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5644364/>
541. Veronesi F, Borsari V, Cherubini A, Fini M. Association of Klotho with physical performance and frailty in middle-aged and older adults: A systematic review. *Exp Gerontol.* 2021 Oct;154(111518):111518.
542. Tang X, Wang Y, Fan Z, Ji G, Wang M, Lin J, et al. Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/ β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma. *Laboratory Investigation* [Internet]. 2016 Feb;96(2):197–205. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002368372202308X>

543. Al-Zahrani M, Yahya F, Assidi M, Dallol A, Buhmeida A. Klotho promoter methylation status and its prognostic value in ovarian cancer. *Mol Clin Oncol*. 2021 Jul 3;15(3):181.
544. Zhou HJ, Li H, Shi MQ, Mao XN, Liu DL, Chang YR, et al. Protective Effect of Klotho against Ischemic Brain Injury Is Associated with Inhibition of RIG-I/NF- κ B Signaling. *Front Pharmacol*. 2018 Jan 18;8.
545. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of Exercise Is a Major Cause of Chronic Diseases. In: *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2012. p. 1143–211.
546. Darren W, Crystal-Whitney N, Shannon B. Health benefits of physical activity: the evidence. *Can Med Assoc J*. 174(6):801–809.
547. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports*. 2015 Dec 25;25(S3):1–72.
548. Gremeaux V, Gayda M, Lepers R, Sosner P, Juneau M, Nigam A. Exercise and longevity. *Maturitas*. 2012 Dec;73(4):312–7.
549. Kim JH, Hwang KH, Park KS, Kong ID, Cha SK. Biological Role of Anti-aging Protein Klotho. *J Lifestyle Med*. 2015 Mar 31;5(1):1–6.
550. Razzaque MS. The role of Klotho in energy metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Oct 29;8(10):579–87.
551. Cheikhi A, Barchowsky A, Sahu A, Shinde SN, Pius A, Clemens ZJ, et al. Klotho: An Elephant in Aging Research. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2019 Jun 18;74(7):1031–42.
552. Torres PU, Prié D, Molina-Blétry V, Beck L, Silve C, Friedlander G. Klotho: An antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney Int*. 2007 Apr;71(8):730–7.

553. Amaro-Gahete FJ, De-la-O A, Jurado-Fasoli L, Espuch-Oliver A, Robles-Gonzalez L, Navarro-Lomas G, et al. Exercise training as S-Klotho protein stimulator in sedentary healthy adults: Rationale, design, and methodology. *Contemp Clin Trials Commun.* 2018 Sep 18; 11:10–9.
554. Fulop T, Larbi A, Witkowski JM, McElhaney J, Loeb M, Mitnitski A, et al. Aging, frailty and age-related diseases. *Biogerontology.* 2010 Oct 18;11(5):547–63.
555. Fontana L, Partridge L. Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans. *Cell.* 2015 Mar;161(1):106–18.
556. Sanchez-Delgado G, Martinez-Tellez B, Olza J, Aguilera CM, Labayen I, Ortega FB, et al. Activating brown adipose tissue through exercise (ACTIBATE) in young adults: Rationale, design and methodology. *Contemp Clin Trials.* 2015 Nov;45(Pt B):416–25.
557. Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMC Med.* 2010 Dec 24;8(1):18.
558. Schulz KF, Grimes DA. Generation of allocation sequences in randomised trials: chance, not choice. *The Lancet.* 2002 Feb;359(9305):515–9.
559. Piercy KL, Troiano RP, Ballard RM, Carlson SA, Fulton JE, Galuska DA, et al. The Physical Activity Guidelines for Americans. *JAMA.* 2018 Nov 20;320(19):2020.
560. Estruch R, Bach-Faig A. Mediterranean diet as a lifestyle and dynamic food pattern. *Eur J Clin Nutr.* 2019 Jul 28;72(S1):1–3.
561. Halliday TM, Davy BM, Clark AG, Baugh ME, Hedrick VE, Marinik EL, et al. Dietary intake modification in response to a participation in a resistance training program for sedentary older adults with prediabetes: Findings from the Resist Diabetes study. *Eat Behav.* 2014 Aug;15(3):379–82.

562. López MDR, Martín-Lagos RA. Guía para estudios dietéticos: álbum fotográfico de alimentos. Editorial Universidad de Granada; 2010.
563. Martínez-Tellez B, Sánchez-Delgado G, Acosta FM, Alcantara JMA, Amaro-Gahete FJ, Martínez-Avila WD, et al. No evidence of brown adipose tissue activation after 24 weeks of supervised exercise training in young sedentary adults in the ACTIBATE randomized controlled trial. *Nat Commun.* 2022 Sep 12;13(1):5259.
564. Amaro-Gahete FJ. Exercise training increases levels of the anti-ageing Klotho protein: health-related cardiometabolic implications. The FIT-AGEING randomised controlled trial (PhD Academy Award). *Br J Sports Med.* 2020 Oct;54(20):1233–4.
565. Maïmoun L, Simar D, Caillaud C, Peruchon E, Sultan C, Rossi M, et al. Effect of antioxidants and exercise on bone metabolism. *J Sports Sci.* 2008 Feb;26(3):251–8.

CURRICULUM VITAE

Andrea Espuch Oliver

Fecha de nacimiento: 17/07/1988. Lugar de nacimiento: Alicante (España)

e-mails: andreaespuch@gmail.com / andrea.espuch.sspa@juntadeandalucia.es

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9013-3621>

Scopus ID: Espuch-Oliver, Andrea

Formación

- **Licenciada en Medicina y Cirugía (2014).** Universidad de Murcia.
- **Experto universitario en Inmunología Clínica (2022).** Universidad Europea Miguel de Cervantes (30 Créditos ECTS). Modalidad virtual.
- **Máster en Genómica y Genética Médica (2020).** Universidad de Granada (60 créditos ECTS). Modalidad virtual.
- **Diploma de Especialización en Bioinformática Clínica (2018).** Universitat de València (26 créditos ECTS). Modalidad semipresencial.

Actividad laboral actual y previa

2022-Actualidad: F.E.A. Análisis Clínicos, responsable Laboratorio de Reproducción Humana Asistida. Hospital Universitario Torrecárdenas (Almería, Andalucía). Servicio Andaluz de Salud.

2020-2023: F.E.A. Análisis Clínicos (médico), responsable Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico. Lorgen Genética Proteónica S.L. (Granada, Andalucía).

2020-2022: F.E.A. Análisis Clínicos, secciones Bioquímica y Microbiología. Hospital General Universitario Nuestra Señora de Prado (Talavera de la Reina, Toledo, CLM). Servicio de Salud de Castilla-La Mancha.

2019: F.E.A. Análisis Clínicos, responsable de los Laboratorios. Red de hospitales: H.A.R. de Alcalá la Real, H.A.R. de Alcaudete y H.A.R. Sierra de Segura. Agencia Sanitaria Alto Guadalquivir, Junta de Andalucía (Andalucía).

2015-2019: Médico Interno Residente de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, Andalucía). Servicio Andaluz de Salud.

Comités científicos, técnicos y/o asesores

Miembro fundador de la reciente **Comisión de Reproducción Humana Asistida** de la Sociedad Española del Laboratorio Clínico (AEFA). Madrid, enero de 2024.

Proyectos I+D+i

2021-2024: **“Caracterización molecular de entidades subclínicas de la infertilidad masculina (AZOONÓMICA2)”**. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs. GRANADA). IP: Rogelio Palomino Morales ($\approx 150,000$ €).

2018-2020: **“Descifrando en cáncer el proceso de equilibrio entre metástasis latentes y sistema inmune”**. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs. GRANADA). IP: Ángel Miguel García Lora ($\approx 160,000$ €).

2017-2020: **“Rol del ejercicio en la regulación de la proteína S-Klotho y otros marcadores de envejecimiento en adultos. Estudio FIT-AGING”**. FEDER Andalucía. IP: Manuel J. Castillo Garzón ($\approx 6,000$ €).

Docencia

Curso 2016-2017: Docente invitada – Prácticas de Inmunología. Facultad de Odontología, Departamento de Microbiología e Inmunología y Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología (Universidad de Granada).

Curso 2017-2018: Docente invitada – Prácticas de Inmunología. Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología (Universidad de Granada).

Premios

- **2º Premio a la mejor comunicación a SANAC XXIV:** “Evaluación del Índice ($K+L$) como biomarcador de actividad en artritis reumatoide”. Comunicación oral presentada en la XXIV Reunión Científica de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos (SANAC). Marzo de 2017.
- **PREMIO CIUDAD DE HUELVA.** “Vitamina D y actividad de la enfermedad en pacientes con artritis reumatoide”. Comunicación oral presentada en la XXV Reunión Científica de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos (SANAC). Marzo de 2018.

Principales publicaciones

Andrea Espuch Oliver; Héctor Vázquez Lorente; Lucas Jurado Fasoli; Tomás De Haro Muñoz; Irene Díaz Alberola; María del Señor López Vélez; María Teresa De Haro Romero; Manuel Castillo Garzón; Francisco José Amaro Gahete. **References Values of**

Soluble α -Klotho Serum Levels Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Healthy Adults Aged 18-85 Years. Journal of Clinical Medicine. 11-9, MDPI, 25/04/2022.

Francisco José Amaro Gahete; Alejandro De la O; Lucas Jurado Fasoli; Andrea Espuch Oliver; Tomás De Haro Muñoz; Ángel Gutiérrez; Jonathan Ruiz; Manuel Castillo Garzón. **Exercise training increases the S-Klotho plasma levels in sedentary middle-aged adults: A randomised controlled trial. The FIT-AGEING study.** Journal of Sports Sciences. 37-19, pp. 2175-2183. 04/06/2019.

Francisco José Amaro Gahete; Alejandro De la O; Lucas Jurado Fasoli; Andrea Espuch Oliver; Tomás De Haro Muñoz; Ángel Gutiérrez; Jonathan Ruiz; Manuel Castillo Garzón. **Body Composition and S-Klotho Plasma Levels in Middle-Aged Adults: A Cross-Sectional Study.** Rejuvenation Res. 2019 Dec; 22(6):478-483. doi: 10.1089/rej.2018.2092. Epub 2019 Mar 1. PMID: 30672377.

Francisco Amaro Gahete; Alejandro de la O; Lucas Jurado Fasoli; Andrea Espuch Oliver; Lidia Robles González; Ginés Navarro Lomas; Tomás de Haro Muñoz; Pedro Femia; Manuel Castillo Garzón; Ángel Gutiérrez. **Exercise training as S-Klotho protein stimulator in sedentary healthy adults: Rationale, design, and methodology.** Contemporary Clinical Trials Communications. 2018-11, pp. 11-19. Elsevier, 18/05/2018.

Díaz Alberola; Gutiérrez Bautista; Espuch Oliver; García Aznar; Anderson; Jiménez; Hidalgo Tenorio; López Nevot. **Incidence, Management Experience and Characteristics of Patients with Giardiasis and Common Variable Immunodeficiency.** Journal of Clinical Medicine. 11-23, pp. 7007. MDPI, 27/11/2022.

Irene Díaz Alberola; Andrea Espuch Oliver; José María García Aznar; Christian Ganoza Gallardo; María Aguilera Franco; Antonio Sampedro; Pilar Jiménez; Miguel

Ángel López Nevot. **Common Variable Immunodeficiency Associated with a De Novo IKZF1 Variant and a Low Humoral Immune Response to the SARS-CoV-2 Vaccine.** Journal of Clinical Medicine. 11-9, MDPI, 20/04/2022.

Actividad científica y otros

- Asistencia y presentación de más de 60 pósteres a congresos nacionales y regionales, incluidos: Congreso Nacional del Laboratorio Clínico - LABCLIN (2016, 2017, 2018,2019, 2021 y 2022) y Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos - SANAC (2016, 2017, 2018, 2019, 2020-2021 y 2024).
- Más de 40 pósteres a congresos internacionales: American Association of Clinical Chemistry (AACC 2016, 2017 y 2018), Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab 2017, 2019 y 2021) e International Federation of Clinical Chemistry - IFCC (WorldLabd 2017 y 2024).
- 2 capítulos de libro en las revistas de las sociedades Nacionales de Laboratorio: Asociación Española de Biopatología Médica - AEBM y Sociedad Española de Medicina de Laboratorio - SEQC.
- 8 publicaciones en revistas del Laboratorio: Clinical Chemistry (Oxford Academic), Revista de laboratorio clínico (Ediciones Doyma, S.L.) y Casos Clínicos en Autoinmunidad IV (SEI).
- Realizados más de 50 cursos de las distintas sociedades de Análisis Clínicos y otros entre los años 2015 y 2024.
- Cotutora de residentes en el H. U. Torrecárdenas (Almería).

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sentido y sincero agradecimiento hacia todas aquellas personas que me han acompañado en la realización de la tesis doctoral, comenzando por el principal promotor de este trabajo y tutor del mismo, el Dr. D. Manuel Castillo Garzón, que ha demostrado plena confianza en mí en reiteradas ocasiones incluso cuando las fuerzas flaqueaban.

A mis queridos directores de tesis, el Dr. D. Tomás de Haro Muñoz, que me impulsó cariñosamente a la realización de este trabajo, y al Dr. D. Francisco Amaro Gahete, que desde el comienzo me ha acompañado en esta aventura de crecimiento personal y profesional.

Gracias también a toda mi familia, en especial a mi madre Amparo y a mi hermana Alejandra, observadoras en la distancia de los vaivenes emocionales, y a mi mujer Irene, apoyo incondicional y ejemplo de esfuerzo y superación: sin vuestro amor, comprensión y ánimos este trabajo nunca hubiera dado sus frutos.

Por último, deseo dedicar este trabajo a mi padre, por el cual siento una gran admiración. Te fuiste demasiado pronto, pero la huella que dejaste perdurará para siempre. La mujer que soy hoy es resultado de los valores que me inculcaste, tu ejemplo y tu apoyo. Soy un orgulloso espejo de ti y así seguirá siendo en las generaciones venideras, Carlos te conocerá a través de mí y tú volverás a estar entre nosotros a través de él.