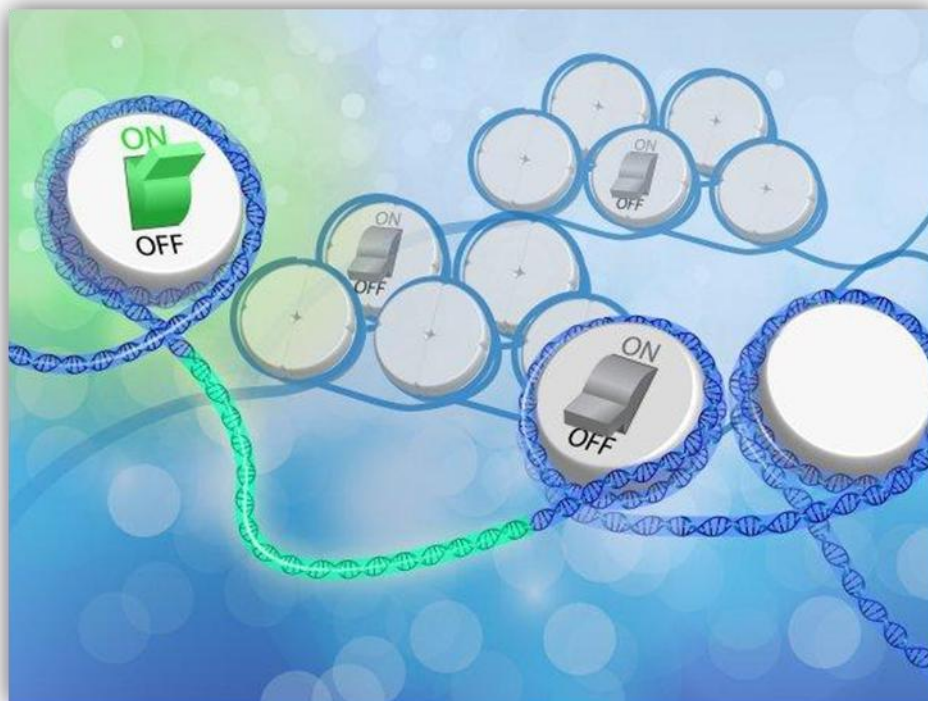


**CURSO ACADÉMICO  
2016-2017**



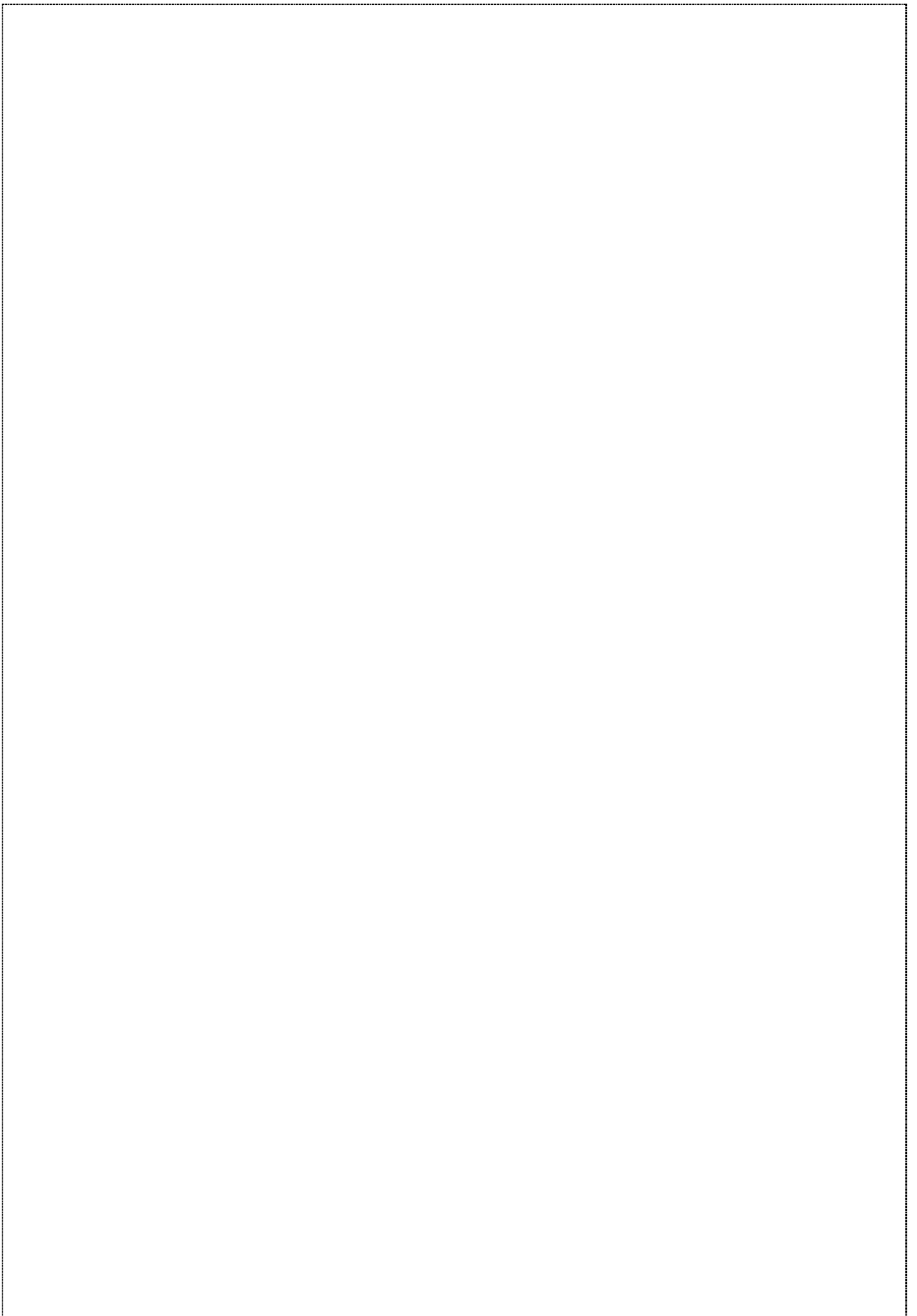
**ROCÍO BURGOS GONZÁLEZ**

Trabajo Fin de Grado

# **INFLUENCIA DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA**

Grado en Farmacia  
Universidad de Sevilla





**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**GRADO EN FARMACIA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



# **INFLUENCIA DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA**

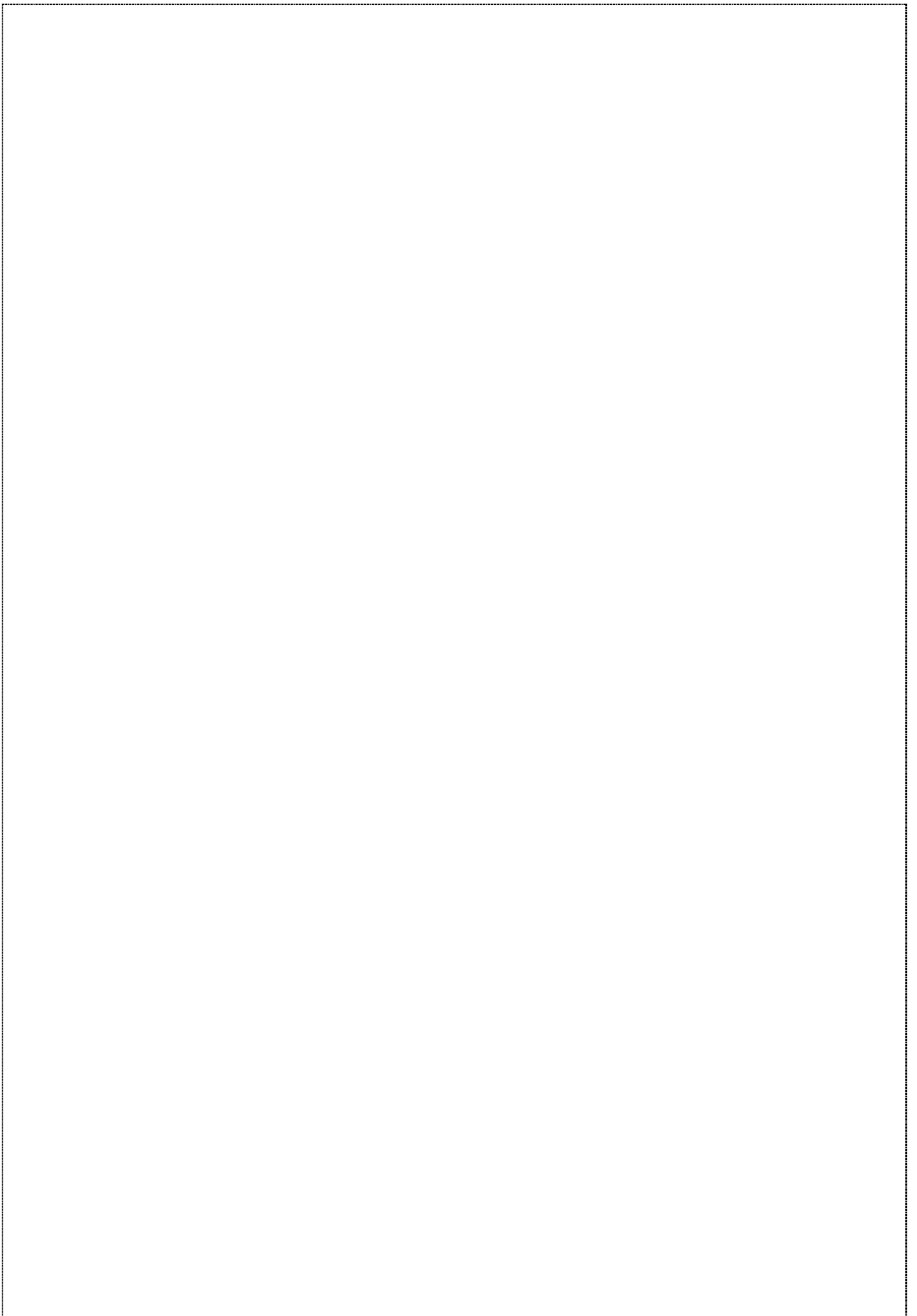
**ROCÍO BURGOS GONZÁLEZ**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Tutora: Angélica Castaño Navarro

Revisión bibliográfica

Sevilla, Junio 2017



## RESUMEN

Hoy sabemos que el fenotipo celular no depende solamente de la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) presente en su genoma, sino que está determinado por la expresión, encendido o apagado, de los genes. Dentro de los mecanismos encargados de regular esta expresión génica, la epigenética ha cambiado nuestro conocimiento acerca de la relación de los genes con el medio ambiente. Los mecanismos epigenéticos son básicamente modificaciones químicas del ADN, que afectan a su expresión pero no a la secuencia, y pueden ser modificados por factores externos como la dieta.

La restricción calórica (RC) es la reducción de la ingesta energética en un 20-40% respecto a la ingesta *ad libitum*, sin eliminar el aporte y las cantidades necesarias de todos los nutrientes esenciales. La RC se considera la única aproximación que de forma convincente ha demostrado ralentizar el proceso de envejecimiento en animales de experimentación por medio de la mejora de la salud y de las patologías asociadas a la edad. Aunque los mecanismos no se conocen con certeza, los datos recogidos muestran que la RC, al igual que otros factores externos, modifica la expresión génica a través de mecanismos epigenéticos (modificación de histonas, metilación del ADN o ARN no codificante). Asimismo, existen moléculas que imitan el efecto beneficioso de la RC en el envejecimiento y que se encuentran en el punto de mira para prevenir y/o tratar determinadas enfermedades. El objetivo fundamental del presente trabajo es comprender cómo y de qué manera la RC afecta a nuestra genética centrándonos en su papel en el envejecimiento.

Palabras clave: restricción calórica, epigenética, envejecimiento, expresión génica.

## ABSTRACT

Today we know that the cellular phenotype does not only depend on the sequence of the deoxyribonucleic acid (DNA) present in its genome, but is determined by the expression, on or off, of the genes. Within the mechanisms responsible for regulating this gene expression, epigenetics has changed our knowledge about the relationship of genes to the environment. Epigenetic mechanisms are basically chemical modifications of DNA, which affect its expression but not the sequence, and can be modified by external factors such as diet.

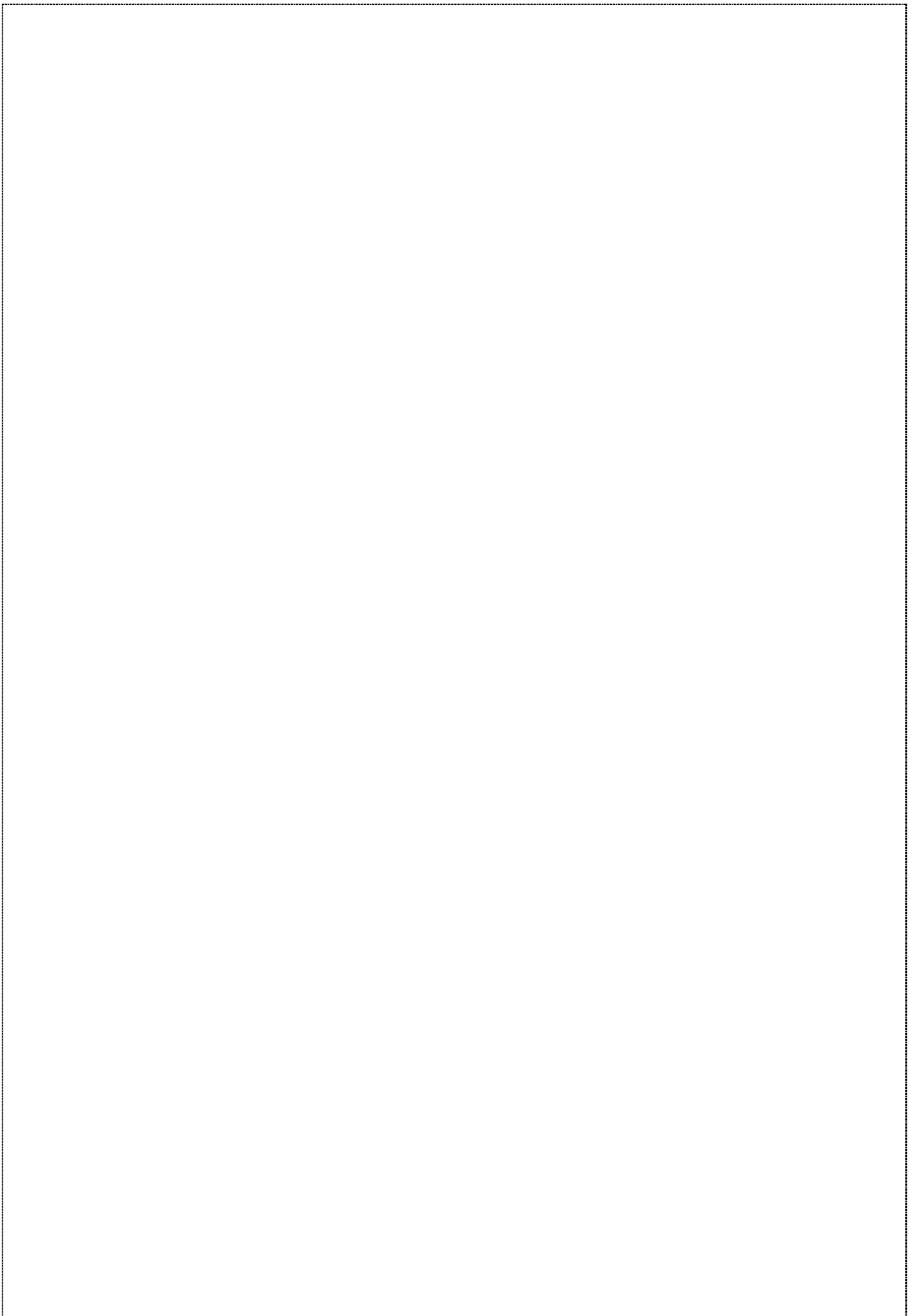
The caloric restriction (CR) is the reduction of energy intake by 20-40% with respect to intake *ad libitum*, without eliminating the contribution and necessary amounts of all essential nutrients. CR is considered to be the only convincing approximation that has been shown to slow down the aging process in experimental animals by improving health and age-related pathologies. Although the mechanisms are not known with certainty, the data collected show

that CR, like other external factors, modifies gene expression through epigenetic mechanisms (histone modification, DNA methylation or non-coding RNA). Also, there are molecules that mimic the beneficial effect of CR in aging and are in focus to prevent and / or treat certain diseases. The main objective of this work is to understand how and in what way the CR affects our genetics, focusing on its role in aging.

Keywords: caloric restriction, epigenetic, aging, gene expression

# ÍNDICE

RESUMEN	Pág
1. INTRODUCCIÓN.....	1
REGULACIÓN E IMPORTANCIA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	1
¿Qué es la regulación de la expresión génica?.....	1
Estructura de genes en eucariotas.....	2
Tipos de genes.....	4
1.1 LA EPIGENÉTICA.....	5
1.1.1 MECANISMOS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA.....	6
1.1.2 HERENCIA EPIGENÉTICA.....	11
1.1.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS MECANISMOS EPIGENÉTICO S.....	11
1.2 RESTRICCIÓN CALÓRICA.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
3. METODOLOGÍA.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1 RC Y SU EFECTO EN EL ENVEJECIMIENTO.....	18
4.2 MIMÉTICOS DE RC (CRM).....	26
5. CONCLUSIONES.....	29
6. BIBLIOGRAFÍA.....	31





## 1. INTRODUCCION

### 1.1 REGULACIÓN E IMPORTANCIA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La determinación de las primeras secuencias de proteínas y la estructura del ADN en la década de los 50 sirvió para posteriormente obtener secuencias de ADN de forma rutinaria hasta llegar, a finales del siglo XX, a la secuenciación completa de diversos genomas (Orengo & Dorcas, 2013).

Comprender cómo está estructurado el ADN y su composición facilitó entender “el código de la vida” y propició la aparición de algún tipo de *determinismo genético*, el cual le daba a los genes el papel de custodiar el destino de cada organismo, siendo los responsables de cualquier particularidad, patología o habilidad. Por lo que, entonces, cada ser vivo estaba ligado a la suerte de heredar unos genes u otros.

Con el tiempo se ha comprobado que el genoma es dinámico (es dañado y reparado por la maquinaria proteica de las células), que existen determinadas secuencias génicas que saltan de un lugar a otro o que, por ejemplo, hay genomas más grandes que integran otros más pequeños, como en el caso de algunos tipos de virus. Además, encontramos un tipo de cambio químico en el ADN, que se trata de modificaciones en los nucleótidos que no alteran la secuencia y que pueden ser revertidas. Son alteraciones capaces de marcar los genes y colocar una señal que de alguna forma afectará a la expresión de los mismos (Romá, 2016).

#### **¿Qué es la regulación de la expresión génica?**

La regulación de la expresión génica es el proceso celular que controla la expresión de productos génicos (ARN o proteínas), determinando cuándo y dónde se activan los genes específicos y la cantidad de proteína o ARN que se produce. La transmisión de la información genética (transcripción), posibilita la formación de moléculas (proteínas y ARN) cuyas funciones van a caracterizar la actividad y morfología de las células. En un organismo no se necesitan todos los productos génicos de forma simultánea, ni a los mismos niveles, con lo cual el sistema de regulación va a servir para ajustar el uso del depósito de información de los ácidos nucleicos a los requerimientos de cada célula o de cada organismo (Isidoro, 2016). La regulación de la expresión génica se da tanto en procariontes como en eucariotes, pero alcanza especial relevancia en los organismos pluricelulares complejos. La diferenciación celular que existe en los organismos pluricelulares, se fundamenta en que aunque en todas las

células de un organismo existe esencialmente el mismo ADN, los tipos y funciones de las células varían y eso es debido a las diferencias cualitativas y cuantitativas en su expresión génica. Esto implica que el control de la expresión génica es la base de la diferenciación y desarrollo de dicha célula (Alberts et al., 2008).

Esta regulación puede llevarse a cabo en cualquier etapa de la síntesis o de la maduración de las macromoléculas. Uno de los puntos de regulación más importantes se realiza a nivel de la transcripción.

Tupler, Perini y Green, en la revista *Nature*, ya hicieron hincapié en que la diversidad en la especialización celular se logra a través de una expresión génica controlada y la regulación precisa de ciertos genes en cada linaje celular (Tupler et al., 2001).

### **Estructura de genes en eucariotas**

Un gen es una secuencia de ADN que codifica un producto funcional (ARN o proteína). La estructura de los genes en eucariotas es compleja. La secuencia de nucleótidos que constituye un gen, y los propios genes entre sí, no se disponen linealmente en los cromosomas sino espaciados por fragmentos de ADN que no poseen información que pueda ser transcrita. En todo gen nos encontramos las siguientes regiones:

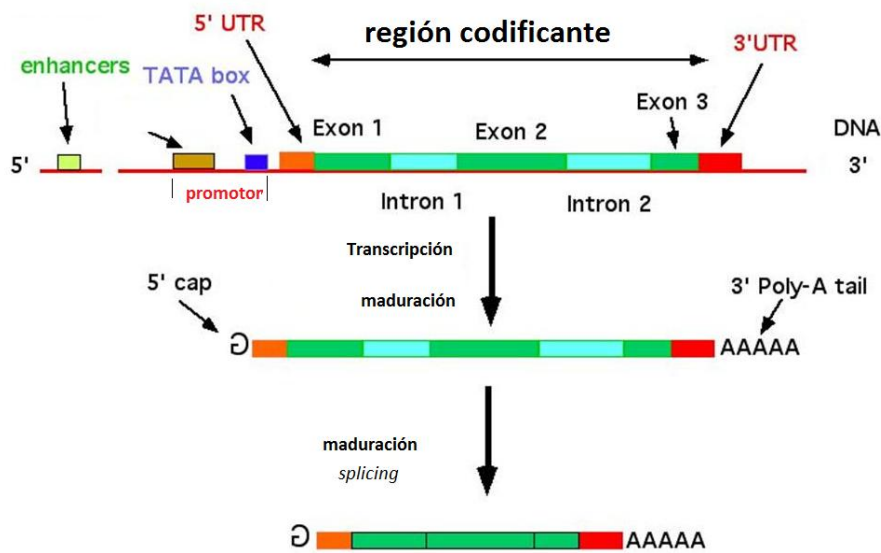
**La región promotora:** es una secuencia del ADN situada en posición 5', al principio del gen, que no codifica para ningún aminoácido y sirve para que la ARN-polimerasa II, enzima clave en el proceso de la transcripción, reconozca el principio del gen. Los promotores tienen secuencias de nucleótidos definidas, como la caja "TATA" y la secuencia Inr. La ARN polimerasa II no actúa aislada sino que se requiere que, previamente, otras proteínas se fijen al promotor; son los "factores de transcripción". Las secuencias TATA e Inr, conocidas como promotor basal, son reconocidas por el complejo TFII (complejo basal de factores de transcripción).

En determinados lugares de la molécula de ADN hay **secuencias reguladoras**, regiones del ADN que determinan el grado en que se expresa un gen. Son las regiones "amplificadoras" (o enhancers) o "silenciadoras", según sea su efecto sobre la transcripción. Generalmente estas secuencias se sitúan cercanas al gen, pero también pueden ubicarse en sitios muy distantes al gen, a miles de pares de bases de este. Estas secuencias serán reconocidas por factores de transcripción específicos.

Por lo tanto, en cada gen, la transcripción comienza en su promotor. Pero para que esto ocurra, se requiere de la interacción de muchas proteínas que se unen de manera específica, posibilitando la acción de la ARN polimerasa II.

**La región codificante:** es la parte del gen que contiene la información para la síntesis de la proteína. En la región codificadora van a existir fragmentos de ADN que no son codificantes: los intrones, y fragmentos que sí codifican: los exones. Considerando la hebra 5'→3', el principio de esta región viene marcado por la secuencia de bases nitrogenadas ATG y el final por un triplete de stop: TAA, TAG, TGA. Las regiones 5' UTR y 3' UTR, a ambos extremos de la región codificante, tienen un papel regulador. Tras la transcripción, las moléculas de ARN sufrirán un proceso de maduración, en el que se eliminan los intrones y se empalman los exones, además de sufrir modificaciones en los extremos: caperuza protectora en 5' y una cola poliAdenilato en 3'.

**La región terminadora.** Marca el final del gen (Feduchi et al., 2015).



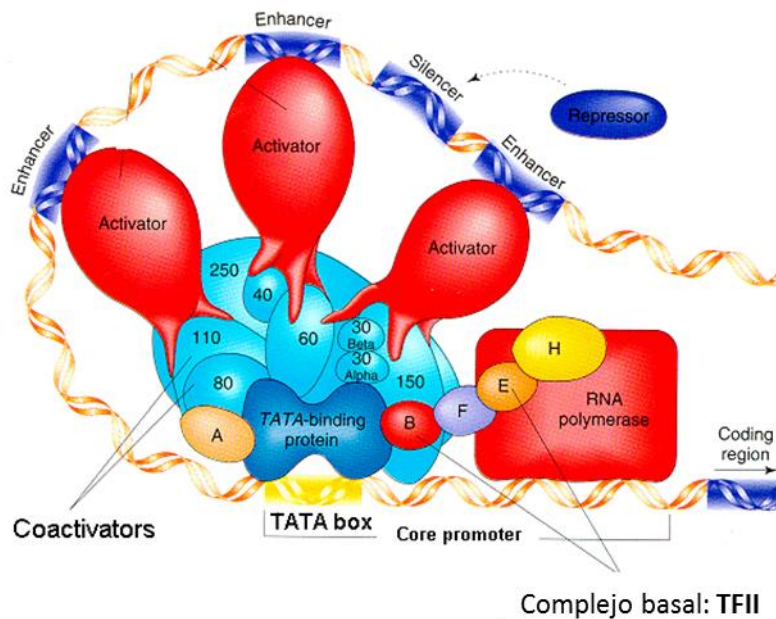
**Figura 1. Partes de un gen eucariota**

La regulación de la expresión génica puede ser positiva o negativa. La **regulación positiva** es aquella en la que la expresión se ve favorecida y en la cual el tipo de proteínas que se unen a la secuencia reguladora (enhancers) se llaman activadores.

La **regulación negativa**, por otra parte, es en la que la expresión se encuentra inhibida y a las proteínas que se unen a las secuencias específicas (silencers), esta vez, se les llama inhibidores o represores. Además otras proteínas, los coactivadores, median en la interacción de los activadores con el complejo ARNpolimerasa-promotor/TFII.

Los activadores facilitan el acople de la ARN polimerasa al promotor y, con ello, la transcripción. Sin embargo, los inhibidores pueden actuar de manera indirecta, uniéndose a

regiones cercanas y bloqueando la formación del complejo ARNpolimerasa-promotoro, de manera directa, bloqueando el sitio de unión de las proteínas activadoras (Figura 2).



**Figura 2.** "Enhancers" y "silencers" con sus respectivas proteínas activadoras y represoras. Imagen tomada de: <https://www.scientificamerican.com/article/molecular-machines-control-genes/>.

### Tipos de genes

Se pueden diferenciar entre dos grandes grupos: genes estructurales y genes reguladores.

Dentro de los genes estructurales encontramos tanto los genes constitutivos como los genes regulables o adaptables.

Los **genes constitutivos** son los genes que se expresan constantemente y se requieren para el mantenimiento de las funciones celulares, ya que el producto de su expresión son moléculas necesarias para que prospere la célula o el organismo en cuestión. Por tanto, es de esperar su expresión en todas las células de un organismo en condiciones normales, con independencia del tipo de tejido, la etapa de desarrollo, el estado del ciclo celular, o señal externa (Eisenberg & Levanon, 2013; Devlin, 2015).

Y los denominados **genes regulables o adaptables** son los genes cuya expresión está ajustada a las necesidades variables de la célula, aumentando o disminuyendo la expresión génica según se necesite aumentar o disminuir la concentración del producto génico, es decir, son aquellos en los que una molécula inductora enciende la expresión de uno o más genes involucrados en el metabolismo de la misma. El control de los genes regulables se realiza mediante proteínas que van a desarrollar un control activador o inhibidor sobre el mecanismo de la transcripción

Por último, los productos de la expresión de los genes reguladores controlan la expresión de los genes estructurales (Devlin, 2015).

La cantidad de una proteína en un momento determinado no solo puede modularse a nivel de transcripción, los mecanismos que regulan la traducción, modificaciones postraduccionales y la degradación de proteínas también influyen. En este trabajo nos centraremos en los mecanismos que actúan a nivel pre y postranscripcional, fundamentalmente en aquellos que se consideran marcadores epigenéticos.

## 1.2. LA EPIGENÉTICA

El término *Epigenética* fue acuñado por Conrad Hal Waddington en 1942 para referirse al estudio de las interacciones entre los genes y el medio ambiente. Todas las células de un individuo presentan el mismo genoma. Una célula del hígado tiene la misma secuencia de nucleótidos de ADN que una neurona, sin embargo, estructural y funcionalmente son muy distintas.

Waddington razonó que debía haber alguna modificación en el desarrollo de éstas que implicara el desarrollo de distintas funciones, es decir, un cierto nivel “por encima” de los genes codificados por la secuencia de ADN, que controlaría su lectura. En este contexto, infirió en la importancia de la interacción gen-ambiente, en la capacidad del medioambiente para moldear el fenotipo de cada célula. (Van Speybroeck, 2002).

Una definición más exacta de la epigenética fue la que nos concedió Robin Holliday en 2002: *“los cambios en la función de los genes que son heredables por mitosis y por meiosis, que no entrañan una modificación en la secuencia del ADN y que pueden ser reversibles”* (Holliday, 2002). Esta definición abarca dos conceptos:

1. Cambios en la herencia de fenotipos no atribuibles a cambios en la secuencia del ADN.
2. La diversidad de fenotipos celulares a partir de un único genotipo.

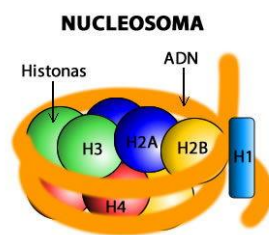
Los mecanismos epigenéticos tratan de modificaciones covalentes por la adición y/o supresión de grupos funcionales (metilos, acetilos y fosfatos), proteínas, ARNs de pequeño tamaño, al ADN o a las histonas, entre otros. Estas modificaciones son unas marcas moleculares detectables cuyo resultado final es un cambio en la actividad transcripcional de los genes y cuando una de estas células se multiplica, estas marcas se transmiten a las células hijas (Morgan & Whitelaw, 2008).

El hecho de añadir estos grupos químicos al ADN, o a las proteínas asociadas, o el hecho de eliminarlos, cambian la expresión de los genes cercanos. Estos cambios en la expresión del gen modifican las funciones de las células e incluso la naturaleza de las mismas (Carey, 2013).

### 1.2.1. MECANISMOS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA

En eucariotas el ADN se localiza en el interior del núcleo celular interactuando con proteínas que regulan su función. La cromatina es la estructura en la cual el ADN está empaquetado dentro del núcleo celular, y está constituida por ADN y proteínas, entre las que destacan las **histonas**.

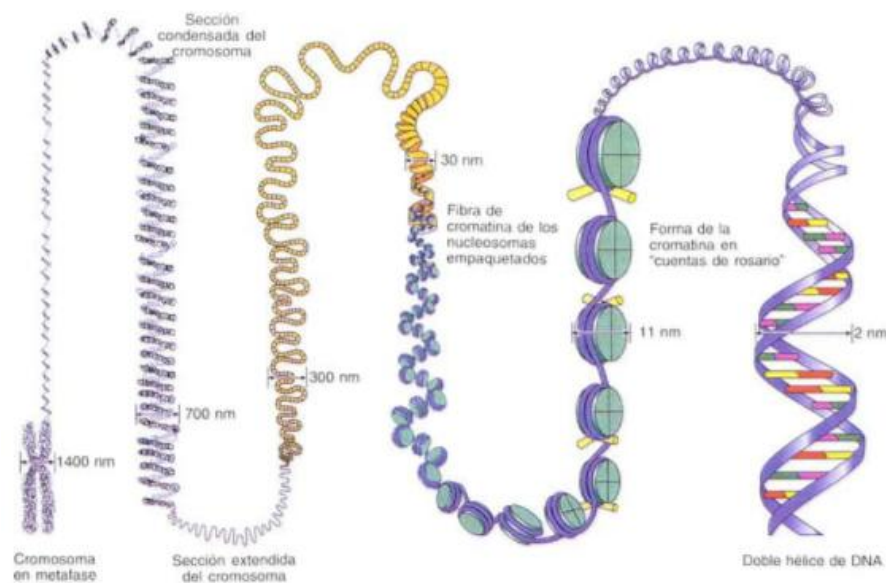
Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas, que en los seres humanos consisten en secuencias de ADN de 147pb (pares de bases) enrollados en un octámero de histonas. Cada octámero está formado por dos copias de las histonas H3, H4, H2A y H2B. Además, en cada nucleosoma hay una molécula de histona H1 (figura 3), que sirve de anclaje.



*Figura 3. Estructura de un nucleosoma (Feduchi et al., 2015).*

Las histonas presentan en su secuencia una serie de aminoácidos con carga positiva que se unen a las cargas negativas de los grupos fosfatos del ADN. Los nucleosomas se asocian entre sí generando estructuras (solenoides, lazos, bandas) donde aumenta progresivamente el grado de compactación de la cromatina, hasta alcanzar el máximo nivel que corresponde al cromosoma metafásico (Feduchi et al., 2015), como se puede observar en la figura 4.

Funcionalmente, el grado de empaquetamiento del ADN determina su accesibilidad. La cromatina puede encontrarse condensada, es la llamada heterocromatina, ADN transcripcionalmente inactivo o bien descondensada siendo el ADN transcripcionalmente activo (eucromatina).



**Figura 4. Grados de empaquetamiento de la cromatina.** Se aprecia el enrollamiento del ADN desde la doble hélice de ADN hasta su forma más compacta, cromosoma metafásico (La imagen ha sido extraída de la página web: <http://resumencromatina.blogspot.com>).

La heterocromatina corresponde a la mayor parte del material nuclear e incluye los telómeros y regiones pericentroméricas; estas regiones tienden a ser ricas en secuencias repetitivas y a tener un bajo contenido génico. El resto del genoma está formado por euromatina, que es transcripcionalmente activo y contiene la mayoría de los genes.

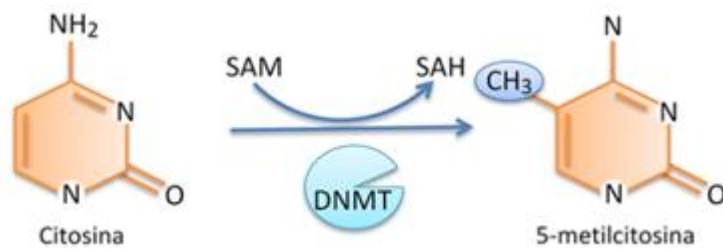
La accesibilidad al ADN para la transcripción depende de la condensación de la cromatina. El inicio de la transcripción de genes requiere que la maquinaria molecular responsable (ARN polimerasa II y factores de transcripción) pueda acceder físicamente a las bases de la hebra de ADN que se han de transcribir y la regulación de este proceso se centra en la interacción de los promotores con los factores de transcripción.

Para las modificaciones en el nivel de compactación de la cromatina, en la célula existen unos complejos proteicos específicos, complejos remodeladores de la cromatina (Romá, 2016).

Las modificaciones de la cromatina en mamíferos ocurren en ámbitos distintos, entre los que se encuentran metilación del ADN y modificaciones de histonas.

### **A) Metilación del ADN**

La metilación del ADN actúa como un marcador epigenético (Ascencio et al., 2004). Se trata de una modificación covalente que tiene lugar en las citosinas en su quinto carbono (5C) dentro de las regiones ricas en CpG de ADN y que es catalizada por metiltransferasas de ADN (DNMT), como se esquematiza en la figura 5.



**Figura 5. La metilación del ADN ocurre sobre el carbono 5 de la citosina.** SAM: S-adenosil-metionina (dador del grupo metilo). SAH: S-adenosil-homocisteína. DNMT: ADN metiltransferasa (<https://geneticamolecularenlar.wikispaces.com>).

La maquinaria de metilación del ADN de los mamíferos está sometida a la acción de, las ya nombradas, DNMT, que establecen y mantienen los patrones de metilación, y las proteínas de unión metil-CpG (MBDs), que se encuentran implicadas en la lectura de las marcas de metilación. También existen evidencias de que una ADN metilasa contribuye a regular los patrones de metilación durante el desarrollo embrionario, aunque se desconoce su modo de acción (Jouvé N, 2010).

Si bien los dinucleótidos CpG están distribuidos a lo largo del genoma humano, existen regiones donde están especialmente concentrados, llamados islas CpG, que son regiones de ADN genómico con una frecuencia elevada de dinucleótidos CpG.

Estas islas CpG se encuentran, en la mayoría de los casos, en el extremo 5' de los genes, donde la metilación del ADN afecta a la transcripción mediante el reclutamiento de las proteínas MBD que funcionan como mediadores entre el ADN metilado y las enzimas remodeladores de cromatina (Ducasse & Brown, 2006).

La mayoría de regiones CpG en el genoma están metiladas, con excepción de los dinucleótidos ubicados en islas CpG cerca a promotores que están típicamente no metilados durante el desarrollo y en tejidos normales. Sin embargo, un grupo de islas CpG en regiones promotoras está metilado de manera tejido específica durante el desarrollo, además de las islas CpG metiladas en procesos de inactivación del cromosoma X e impronta genética en tejidos normales (García et al., 2012).

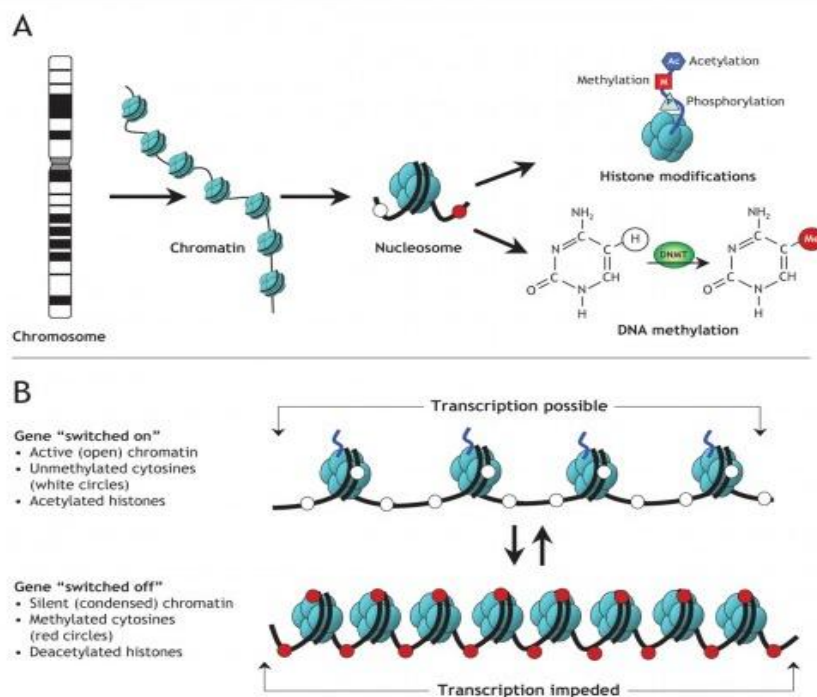
El silenciamiento de los genes, con respecto a la metilación, ocurre principalmente a través de una reducción en la unión de factores de transcripción cuando la modificación se encuentra en dicho sitio de unión o al reclutamiento de represores como proteínas de unión a CpG (MCP) y desacetilasas de histona (HDAC) (Krause, 2016). Las alteraciones en el patrón de metilación del ADN juegan un papel importante en diferentes estados patológicos y en el proceso de transformación celular (Ascencio et al., 2004).



## B) Modificaciones químicas de las histonas

En las células eucariotas encontramos principalmente cinco tipos de histonas: H1 o histona de unión, y cuatro histonas nucleosómicas H2A, H2B, H3 y H4 que conforman el octámero que envuelven los nucleosomas. Todas ellas tienen una estructura similar: un dominio central para ensamblarse al octámero, y extremos N-terminales ricos en aminoácidos básicos, lisina y arginina, principalmente, que gracias a sus cargas positivas estabilizan las cadenas de ADN al neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfatos.

Se ha descrito una variedad importante de modificaciones post-traduccionales en los extremos de las histonas. Estas modificaciones que incluyen metilación en los residuos de lisina y arginina, acetilación en residuos de lisina, ubiquitinación y sumoilación de lisinas y fosforilación de serinas y treoninas, pueden provocar cambios en la estructura del nucleosoma, y en la condensación de la cromatina (Chaudry et al., 2017).



**Figura 6. A) Metilación del ADN por la DNMT y modificaciones en las histonas (Acetilación, metilación y fosforilación, entre otras). B) Representación gráfica de la transcripción posible y la transcripción impedida según el grado de compactación.**

En la figura 6 se explica gráficamente cómo la molécula de ADN se empaqueta alrededor de las histonas, formando la cromatina, y además cómo las modificaciones en las histonas (acetilaciones, metilaciones y fosforilaciones) o en el propio ADN (metilaciones) facilitan o impiden la transcripción de los genes: es decir, su lectura y posterior conversión a proteínas.

Los nucleosomas se descondensan y relajan a través de la acetilación de estas proteínas (Jouvé N, 2010). La acetilación de histonas, llevada a cabo por las histonas acetiltransferasas (HATs), provoca generalmente una descompactación local del ADN y por lo tanto está asociada a una mayor transcripción; en cambio, las histonas desacetilasas (HDACs) tienen el efecto contrario. La organización dependerá de cada célula y si el ADN se encuentra muy compactado será más complicado que determinadas secuencias del ADN interactúen con proteínas como los factores de transcripción con la consecuente no expresión génica.

Aunque el significado de estas modificaciones aún no ha sido comprendido por completo, se sabe que la acetilación y metilación de residuos de lisina son marcas clave para la activación o represión transcripcional, influyendo en el potencial de expresión génica del ADN al modificar la accesibilidad que tiene la maquinaria transcripcional a este (García et al., 2012).

### **C) ARN no codificante**

Los dos mecanismos anteriores (tanto la metilación del ADN como las modificaciones en las histonas) actúan regulando la expresión génica a nivel pre-transcripcional. Además, dentro de los marcadores epigenéticos, nos encontramos con la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional por los ARN no codificantes (ARNnc): micro ARNs (miRNAs) y “long non coding RNAs” (lncRNAs).

Se calcula que en el genoma humano alrededor de 5.000 genes corresponden a ARNs no codificantes. Dentro de estos hay unos 1.300 que son miRNAs de aproximadamente 22 nucleótidos, de ahí su nombre (Juvenal, 2014).

Estas regiones no eran consideradas importantes, puesto que no se les asignaba ninguna función. Posteriormente, se pudo comprobar que había diferencias entre los ARN no codificantes según el tipo de célula y que presentaban algún tipo de control sobre los genes (Carey, 2013).

Los microARN son ARNs de pequeño tamaño, entre unos 18 y 25 nucleótidos, endógenos, que no codifican proteínas e impiden la expresión de determinados genes. Esto es así puesto que bloquean la traducción o median la degradación de ARN mensajeros específicos, lo que se traduce en una menor síntesis de proteínas (Brian & Cavagnari, 2012).

Los lncRNAs, son ARNs no codificantes de más de 200 nucleótidos, que tienen varias funciones, principalmente la regulación de la expresión de genes y la inactivación del cromosoma X (Juvenal, 2014).

## 1.2.2 HERENCIA EPIGENÉTICA

Las marcas epigenéticas de un individuo están sometidas a factores ambientales (ver siguiente apartado). Durante la embriogénesis, los gametos sufren una reprogramación genética, borrado de los marcadores epigenéticos (metilación de ADN) para asegurar la totipotencialidad de las células embrionarias en la descendencia. Posteriormente, se lleva a cabo un proceso de impronta génica (remetilación), marcado del ADN en las células gonadales para indicar en la descendencia si el gen heredado procede del padre o de la madre. Asimismo, tras la fertilización, durante la embriogénesis, se llevan a cabo la desmetilación y posterior colocación de marcadores epigenéticos. Fallos en los mecanismos que regulan estos procesos, pueden originar que marcas epigenéticas adquiridas por factores ambientales, puedan pasar a la descendencia (García et al., 2012).

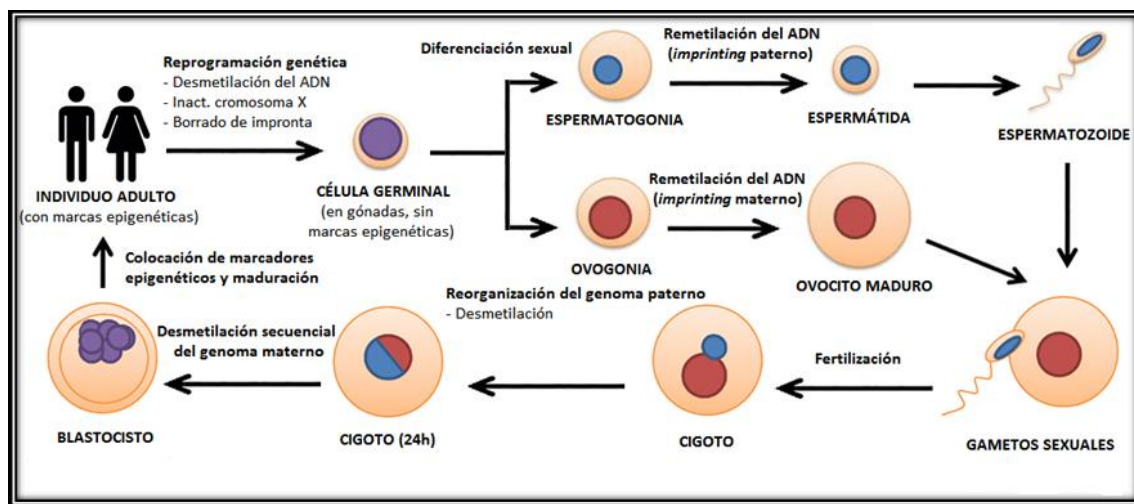


Figura 7. Marcas epigenéticas en la descendencia.

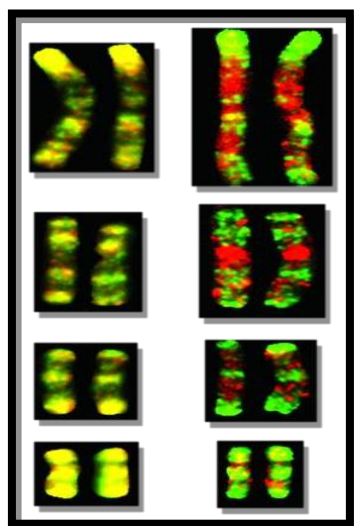
## 1.2.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Las modificaciones epigenéticas pueden darse en respuesta a estímulos ambientales como el estrés, la alimentación, la exposición a tóxicos...

Investigaciones epidemiológicas sugieren que los **factores ambientales** causan efectos significativos en las enfermedades. Así, cada región del mundo tiene una frecuencia de enfermedad distinta. Por ejemplo, mientras que en América del Norte tienen altas tasas de enfermedad de próstata y bajas tasas de enfermedades de estómago, en Asia Oriental, sucede al revés, existen tasas altas de enfermedades de estómago y bajas de enfermedades de próstata. Además, curiosamente, cuando gemelos idénticos se desarrollan en diferentes regiones geográficas, también tienen diferentes frecuencias de la enfermedad. Por lo tanto,

aunque la genética es casi idéntica, el desarrollo de la enfermedad es diferente, lo que sugiere una importante influencia ambiental (Skinner, 2010).

Por tanto, la variación en las exposiciones ambientales durante períodos críticos del desarrollo podrían dar lugar a diferencias epigenéticas y, en consecuencia, fenotípicas más tarde en la vida (Szyf, 2007). Hay que resaltar las evidencias que muestran los estudios sobre marcas epigenéticas en gemelos. Como ejemplo citaremos una investigación llevada a cabo en 2005 por el doctor Manel Esteller, científico español de gran prestigio en este campo, que comparó los patrones de metilación del ADN en 40 parejas de gemelos de entre 3 y 74 años, mostrándose en color amarillo los segmentos que coincidían por completo (Figura 8). En gemelos de 3 años (izquierda) estos patrones coincidían en un porcentaje muy elevado, mientras que en gemelos de 50 años (derecha), apenas eran pequeños puntos aislados los que coincidían por completo, con lo que se demostró que, aunque inicialmente el epigenoma es prácticamente igual, la influencia de estos factores a lo largo del tiempo, es capaz de hacer que cambie enormemente (Esteller, 2017).



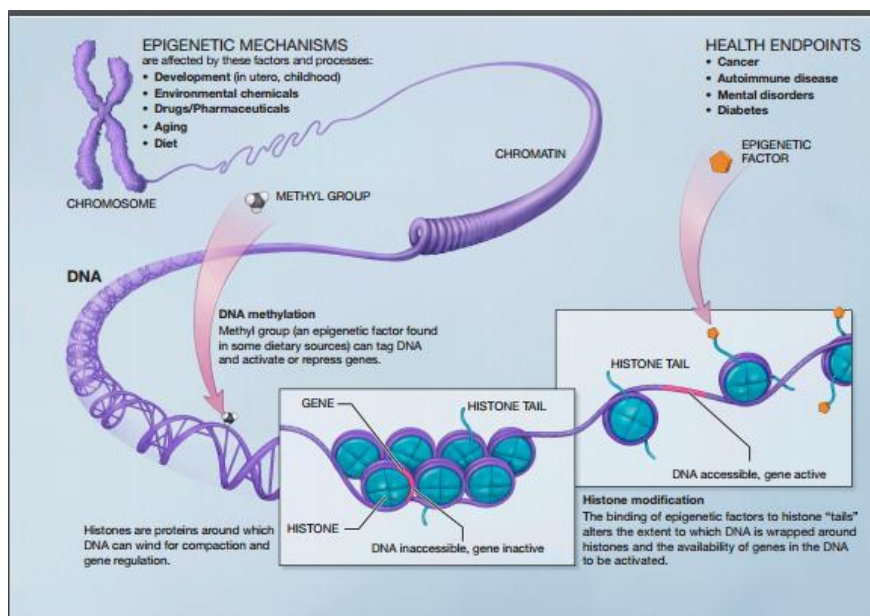
*Figura 8. Cromosomas de gemelos con diferentes patrones de metilación (Esteller, 2017).*

### ***El estrés***

El Dr. Michael Meaney, profesor de neurología de la Universidad McGill de Canadá, realizó algunas investigaciones sobre los factores de variación del comportamiento a partir de la base genética. La intención de este trabajo consistía en analizar la influencia de la conducta de las ratas madres en las crías.

Según el grado de atención de las ratas madres (en lenguaje roedor: lamer o asear) hacia sus crías durante la infancia causaba variación en la expresión de hormonas, en las crías, como la

corticosterona, cuando llegaban a su adultez. Cuanto más lamían las madres a sus crías, éstas presentaban menos índices de producción de corticosterona cuando eran adultas. Cuando las ratas crecieron, examinaron los genes que regulan la producción de receptores de glucocorticoides, que son los encargados de estabilizar el nivel de hormonas relacionadas al estrés y observaron como las crías que habían sido poco cuidadas presentaban los genes altamente metilados, no así en las crías de madres cuidadosas. Esta mayor metilación impidió que el número normal de receptores de glucocorticoides fuera transcrito en el hipocampo de las ratas cuando estas eran unas crías y la insuficiencia de estos receptores generó que estas ratas al ser adultas desarrollaran mayor nerviosismo y estrés (Bagot et al., 2012).



**Figura 9. Una ilustración científica de cómo los factores influyen en los mecanismos epigenéticos y de cómo éstos pueden afectar a la salud (Imagen tomada de <http://commonfund.nih.gov/epigenomics/figure.aspx>).**

### **La dieta**

De todos los factores que influyen en los marcadores epigenéticos, especial relevancia adquiere la dieta. A pesar de que los mecanismos por los cuales la dieta altera la epigenética no se conocen completamente, existen evidencias de la influencia de la misma en la epigenética:

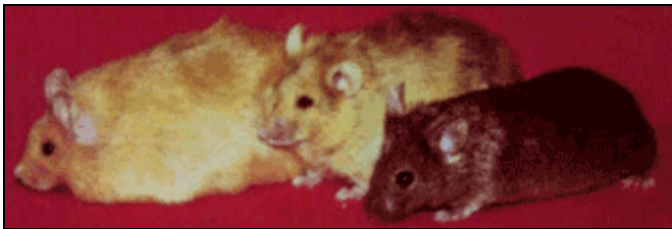
#### 1) Ratones Agouti

La pigmentación del pelo en mamíferos depende fundamentalmente del número de melanocitos y de sus niveles de actividad melanogénica. Existen dos tipos de melanina: la

eumelanina, que da lugar a una coloración marrón-negriza y la feomelanina que está asociada al color rojo-amarillento. La proteína que es codificada por el gen Agouti compite con la hormona estimulante de melanocito (MSH) por su receptor (MC1R). La unión de la proteína agouti a MC1R da lugar a la síntesis de feomelanina (Dolinoy, 2008)

Por otra parte, esta proteína es un neuropéptido y también actúa como antagonista de los receptores MCR3 y MCR4, localizados en el hipotálamo, que están implicados en la regulación del apetito. Su acción bloquea estos receptores y causa una sensación excesiva de apetito.

Cuando el gen agouti de un ratón se encuentra metilado, se reprime la expresión génica del mismo y los ratones tienen un peso normal y su pelaje es de color negro; sin embargo, cuando el nivel de metilación es bajo, los ratones presentan un color amarillento-rojizo, debido a la síntesis de feomelanina, y son obesos por carecer de la sensación de saciedad (Rosenfeld et al., 1998).



**Figura 10. Genéticamente idénticos, epigenéticamente diferentes.** Estos tres ratones son genéticamente idénticos, sin embargo, diferencias epigenéticas dan lugar a muy diferentes fenotipos (Duhl et al., 1994).

Ambos ratones, gordos-amarillos y marrón-flacos son genéticamente idénticos. Los ratones amarillos difieren en la epigenética. Curiosamente si los ratones hembras amarillos embarazadas se alimentan con una dieta rica en nutrientes que aportan metilo, la mayor parte de sus crías son de color marrón y sanos (Kucera et al., 1996).

## Nutrientes que pueden afectar a nuestro genoma

Nutriente	Alimento	Papel Epigenético
Metionina	Semilla de sésameo, pescado, espinacas, pimientos...	Síntesis de SAM
Ácido fólico	brócolis, semilla girasol, levadura de pan, hígado	Síntesis de Metionina
Vitamin B12	carne, hígado, mariscos, leche	Síntesis de Metionina
Vitamin B6	carnes, frutos secos, verduras...	Síntesis de Metionina
Colina	yemas de huevo, hígado, soja, carne cocinada, pollo, ternera y pavo	Donador de Metilo a SAM
Betaina	Remolacha, espinacas, mariscos y azúcar	Descomponer los subproductos tóxicos de la síntesis de SAM
Resveratrol	Vino tinto	Desacetilasa de histonas (Sirt)

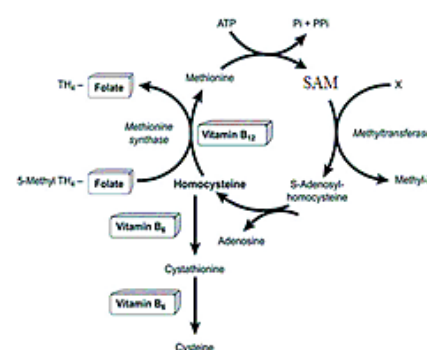


Tabla 1. Nutrientes y su papel epigenético.

### 2) Hambruna y epigenética

Estudios realizados en zonas de Holanda aisladas durante la ocupación nazi, así como en localidad sueca de Överkalix, han puesto de manifiesto como la alimentación de la madre durante la gestación puede afectar epigenéticamente a las generaciones posteriores. En ambos casos, las madres gestantes sufrieron hambruna y estas circunstancias se manifestó con una mayor probabilidad de padecer diabetes no solo en hijos sino también en nietos (Ekamper et al., 2015; Henderson, 2010). Los estudios han puesto de manifiesto que estas alteraciones están asociadas a hipometilación del gen de IFG-2 (hormona del crecimiento asociado a insulina).

### 3) Abejas reinas y abejas obreras

Mientras que una abeja obrera tiene una esperanza de vida de semanas, las abejas reinas pueden llegar a vivir años. Las abejas reinas llegan a poner hasta 2000 huevos, sin embargo, las obreras son estériles.

La abeja reina y la trabajadora son genéticamente idénticas. El origen de sus diferencias se encuentra en la nutrición.

Si bien todas las larvas se alimentan en sus inicios con jalea real, las larvas obreras pasan, más tarde, a una dieta basada en polen y néctar. Esto no ocurre así en los estadios de las abejas reinas, puesto que ellas siguen alimentándose de jalea real durante su etapa adulta. Este

hecho es el causante de las notables diferencias de comportamiento, anatómicas y fisiológicas entre ambas. (Chittka & Chittka, 2010)

Esta dieta especializada se cree que afecta una modificación química como es la metilación del ADN de la abeja, lo cual hace que el genoma de cada una de ellas muestre distintos patrones. Se ha comprobado que, a partir del silenciamiento de la actividad de la enzima DNMT3, se pueden generar abejas adultas con características de las reinas (Lyko et al., 2011). El mecanismo se debe a la proteína royalactina que se encuentra en la jalea real (antes denominada 57-kDa, por su peso molecular), que activa la quinasa p70S6 que incrementa la actividad de la quinasa MAP y, por consiguiente, se produce el silenciamiento de la expresión de la enzima DNMT3, clave en la reprogramación global de la larva (Kucharski et al., 2008).

### **1.3 RESTRICCIÓN CALÓRICA**

La restricción calórica (RC) consiste en la reducción de la cantidad de alimento ingerido entre el 20-40% respecto a la ingesta ad libitum, sin llegar a la malnutrición, manteniendo los niveles de los nutrientes esenciales necesarios.

Hablamos de restricción calórica cuando desde el punto de vista nutricional la dieta es equilibrada y suficiente pero restringida desde el punto de vista del aporte calórico total (Bacalini et al., 2014; Cauwenberghe et al., 2016; Radler et al., 2014).

McCay, Crowell y Maynard en 1935 (McCay et al., 1989) fueron los primeros en publicar un estudio en el que se demostraba que las ratas sometidas a RC tenían una mayor esperanza de vida, en un 33%, que el grupo control con alimentación ad libitum. Además las ratas sometidas a RC presentaban un aspecto más saludable y juvenil y parecían más sanas que las del grupo control.

La RC es la única aproximación que de forma convincente ha demostrado enlentecer el proceso de envejecimiento en numerosos tipos de animales de experimentación.

Dichos estudios, posteriores al pionero de McCay, confirman que en diferentes especies como levaduras, gusanos, moscas, peces o roedores, es apreciable que dicha reducción en la ingesta de energía (calorías) conduce a un retraso del proceso de senescencia y de la aparición de enfermedades crónicas asociadas comúnmente con el aumento de la morbilidad y la mortalidad de la vejez (Bales & Kraus, 2013).

En cuanto a humanos, existen evidencias a partir de estudios epidemiológicos que relacionan los beneficios de la RC; así la dieta Okinawa, caracterizada por una baja ingesta calórica, es considerada la gran responsable de la alta longevidad y buen estado de salud de los habitantes de las islas de Okinawa (Japón) (Taormina & Mirisola, 2015; Willcox et al., 2009). Asimismo, los



proyectos CALERIE y “Caloric restriction in Biosphere2” han llevado a resultados que, al menos, demuestran un efecto positivo de la RC sobre diversos parámetros de salud (CALERIE, 2017; Biosphere 2).

Podemos decir que la RC se considera la única estrategia no farmacológica que ha demostrado ser eficaz en la prolongación de la vida media. La RC y los procesos nutricionales derivados de la misma, provocan modificaciones epigenéticas que están directamente asociados al aumento de la esperanza de vida en muchas especies diferentes (Lardenoije et al., 2015; Lee & Longo, 2016; Li & Tollefsbol, 2011).

## **2. OBJETIVOS**

- Realización de una revisión bibliográfica que nos permita recopilar recopilando las principales líneas de investigación sobre la Restricción calórica y su papel en los mecanismos epigenéticos.
- Revisión bibliográfica de los estudios sobre la RC enfocados a su potencial uso en la prevención de enfermedades.
- Establecer nexos entre diferentes estudios para futuras investigaciones.

## **3. METODOLOGÍA**

Para el desarrollo de conceptos básicos de la introducción se han utilizado textos clásicos de Bioquímica y Biología Molecular como “Lehninger. Principios de Bioquímica”, “Biología Molecular de La Célula” o “Biología Molecular e Ingeniería Genética”

El presente trabajo de revisión bibliográfica ha sido realizado mediante la búsqueda exhaustiva de artículos científicos, tanto experimentales como bibliográficos, en bases de datos certificadas como Pubmed o Scopus. Para lograr acotar los resultados se utilizaron varios términos o palabras clave como criterios de búsqueda, como: “Epigenetic”, “Caloric restriction”, “Genetic expression”, “Epigenetic & Caloric restriction”, localizando y seleccionando la información más precisa de la masa documental.

En una búsqueda inicial se encontraron artículos y revisiones de interés que permitieron realizar una búsqueda sistemática más concreta centrándose en los trabajos que abordan la relación restricción calórica-expresión génica.

Las referencias fueron seleccionadas en base a criterios de calidad: prestigio de la revista, número de citas del artículo o página en la que aparecían publicados y de la experiencia de los autores.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El estudio de la epigenética y la influencia de la RC en ella, se ha centrado especialmente en el envejecimiento y en las patologías asociadas al mismo, obteniéndose múltiples resultados.

### **4.1. RC Y SU EFECTO EN EL ENVEJECIMIENTO**

Con el tiempo el organismo pierde progresivamente la capacidad de adaptación y los mecanismos homeostáticos se vuelven más lentos y menos eficaces. El envejecimiento provoca un deterioro funcional progresivo y se puede definir como la acumulación de daño en las moléculas, células y tejidos durante toda la vida, determinado por factores genéticos y ambientales.

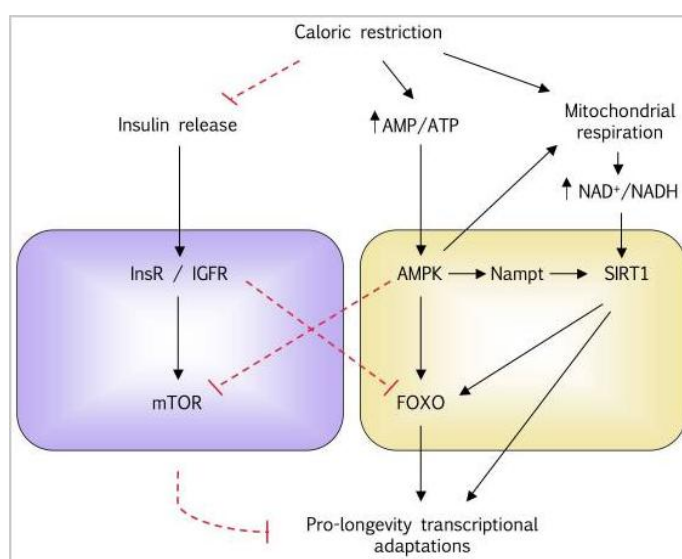
En la actualidad, se conoce que algunos cambios del envejecimiento están programados, mientras que otros son aleatorios y no tienen una forma predecible. La gran variación que se observa entre los diferentes promedios de vida de cada especie sugiere que la esperanza de vida está determinada por sus genotipos específicos (Rodríguez-Rodero et al., 2011). Sin embargo, la variación en la duración de la vida de los individuos dentro de una misma especie parece ser debida a la acumulación en el tiempo de diferentes tipos de errores moleculares que comprometen la función de las células madre adultas. Estas alteraciones pueden ser genéticas o epigenéticas dependiendo de los factores hereditarios, ambientales y ectocásticos del individuo en cuestión (Fraga, 2009). Los cambios epigenéticos no sólo tienen lugar durante el desarrollo embrionario, sino que nuestros genes están expuestos a diversos factores que pueden conllevar a un cambio genotípico durante todas y cada una de las etapas de la vida. De hecho, la edad está estrechamente relacionada con cambios en los patrones de metilación, que conllevan una progresiva disminución de la homeostasis y alteración de la expresión génica. Con la senescencia, en general, se produce una hipometilación del ADN. La RC impide los cambios en la metilación que acompañan al envejecimiento pudiendo extender el tiempo de vida y retrasar la aparición de la senescencia. Además, se ha observado también cierta relación beneficiosa entre la RC y respuestas anticancerígenas (García & Pérez de la Cruz, 2013).

En la mayoría de las intervenciones se recurre a la reducción de los efectos negativos de una enfermedad específica relacionada con el envejecimiento. Esto no es así en el caso de la RC, ya que se cree que modifica los procesos biológicos fundamentales que regulan el envejecimiento y la longevidad. Aun así queda mucho camino por recorrer y sus mecanismos, que se encuentran bajo intenso estudio, no están totalmente claros (Messaoudi et al., 2006).

Son varios los mecanismos biológicos que se asocian al incremento de la longevidad asociada a la RC. Así, el envejecimiento se caracteriza por un incremento en el daño oxidativo a proteínas y la RC disminuye la expresión de genes implicados en el estrés oxidativo, lo cual lleva a una disminución del daño oxidativo en distintos tejidos. Por otra parte, la RC regula la autofagia (“autodegradación de orgánulos y macromoléculas dañadas”), mejora funcionalmente el sistema ubiquitin-proteosoma (UPS); la eliminación de proteínas dañadas y la biogénesis mitocondrial, lo cual permite el mantenimiento de la proteostasis celular (Anton & Leeuwenburgh, 2013).

Entre las vías de señalización asociadas a la RC y el incremento de la longevidad, especial mención merecen las Sirtuinas, enzimas dependientes de  $\text{NAD}^+$  con actividad desacetilasa de histonas. El hecho que  $\text{NAD}^+$  sea un cofactor importante en la cadena de transporte electrónico y participe en muchas reacciones metabólicas representa un nexo importante entre el metabolismo energético y estas enzimas que pueden actuar como detectores del estrés metabólico/energético. Se conocen al menos siete sirtuinas (SIRT1-7) siendo en mamíferos SIRT1 y SIRT3 las más relacionadas con la mejora de parámetros de salud y longevidad.

Además de la vía de las sirtuinas, existen otros vías de señalización implicadas en el mecanismo de acción de la RC: i) Vía de Insulina/ IGF-1 (IIS), ii) Vía de señalización de AMPK y iii) Vía de señalización de mTOR (Cantó & Auwerx, 2009). mTOR y AMPK (quinasa dependiente de AMP) son detectores de situaciones de abundancia o escasez de nutrientes respectivamente.



**Figura 11. Vías de detección de nutrientes.** Las líneas discontinuas rojas indican la inhibición y las continuas negras, la activación (Cantó & Auwerx, 2009).

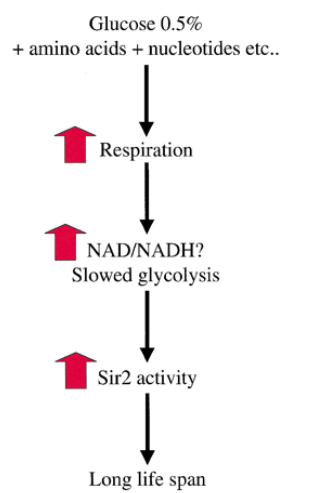
## Vía de las sirtuinas

En relación a los estudios sobre cómo la RC puede modular epigenéticamente la longevidad, existen diversos enfoques en distintas especies, así en *Saccharomyces cerevisiae* son diversos los genes que regulan la longevidad de las levaduras. El gen más estudiado es el *sir2*, que codifica el factor regulador de la cromatina **SIR2** (*Silencing Information Regulador-2*), desacetilasa de histonas dependiente de  $\text{NAD}^+$ , que inhibe la recombinación y detiene la transcripción de diversos *loci* en el genoma. La pérdida de función de *sir2* por mutación acorta la vida en *S. cerevisiae* y, por el contrario, el incremento del número de copias del gen la alarga hasta un 40%, al volver la cromatina a un estado más joven con el consiguiente incremento en la longevidad (Imai et al., 2000).

Uno de los estudios realizados en 2004 puso de manifiesto que la RC activaba el gen *sir2*, siendo así codificada su proteína SIR2, que es activada normalmente por la coenzima  $\text{NAD}^+$ . La forma reducida de esta coenzima, NADH, inhibe la SIR2 mediante bloqueo de la acción de  $\text{NAD}^+$ .

Durante la RC, los niveles de NADH se reducen en las células y esto permite que se active SIR2 y, en consecuencia, el aumento de la esperanza de vida (Guarente et al., 2004). Con la disminución de concentración de glucosa del 2% al 0,5% en el medio habitual de la levadura conseguimos que ésta se encuentre en condiciones de RC. Las células de la levadura responden aumentando la tasa de carbono, generando ATP por la respiración. Esto se produce a expensas de una disminución de la fermentación, que es la vía de prioridad cuando los niveles de glucosa son elevados (Lin et al., 2002).

Este cambio es necesario y suficiente para extender el tiempo de vida en la levadura, ya que con la activación de la respiración se convierte más NADH en  $\text{NAD}^+$  y el incremento en la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  activa a Sir2 (Bitterman et al., 2002).

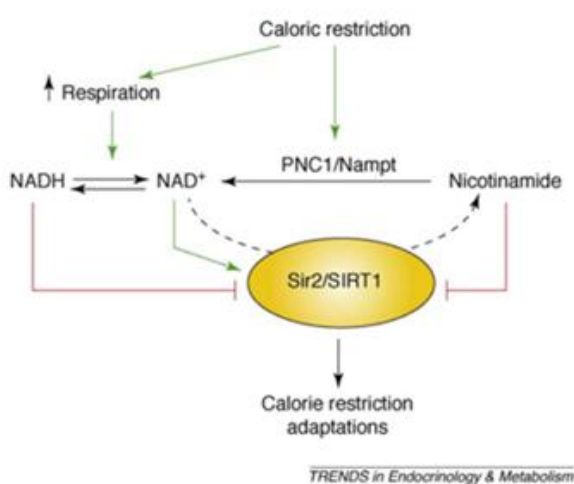


**Figura 12. Esquema de cómo afecta la RC a la longevidad de las levaduras (Lin et al, 2000).**

**SIRT1:** es el ortólogo en mamíferos (ortólogo de SIR2 en levaduras) es un miembro de la familia de las Sirtuinas, todas con actividad desacetilasas de histonas (HDAC) dependientes de  $\text{NAD}^+$ , que tiene un papel importante en la regulación de la vida media y se sabe que la RC induce su expresión.

Los niveles de SIRT1 están aumentados en varios tejidos durante la RC. Este aumento puede estar determinado por el incremento de  $\text{NAD}^+$  disponible en el núcleo de las células, afín a una disminución en el flujo por la glucólisis (reducción de  $\text{NAD}^+$  a NADH).

Por otra parte, RC conduce a un aumento en la expresión del gen *PNC1*, responsable de la codificación de la enzima Nampt. Una mayor actividad de Nampt favorece el paso de nicotinamida (NAM) a  $\text{NAD}^+$  y se acumula aún más  $\text{NAD}^+$  que intensifica la actividad reguladora transcripcional del dominio catalítico de SIRT1.



**Figura 13. Representación esquemática del impacto de la RC sobre la actividad de SIRT1.** En situación de RC, se induce el metabolismo respiratorio como principal fuente de energía. Así, se produce un desplazamiento del equilibrio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  a favor de  $\text{NAD}^+$ . Debido a que  $\text{NAD}^+$  es modulador de la actividad de SIRT1, su aumento en RC produce un incremento en la actividad de SIRT1. Imagen tomada de Cantó & Auwerx, 2009.

La regulación y aumento de la expresión de SIRT1 hace que aumente la resistencia al estrés por la regulación negativa de factores de transcripción proapoptóticos, como p53 o FOXO.

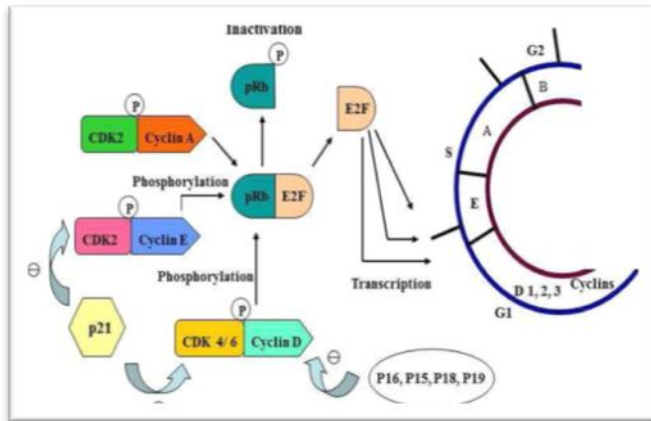
Por un lado, p53 es una proteína que juega un papel clave en el control del crecimiento celular, la apoptosis y la reparación de ADN y se activa, mediante acetilación de histonas, en respuesta a la radiación o al estrés, induciendo la senescencia celular. En contraposición, SIRT1 regula negativamente p53, suprimiendo la apoptosis dependiente de p53 tanto *in vitro* como *in vivo*. Y, por otro lado, FOXO, factor de transcripción de la familia "Forkhead", que controla diversas funciones biológicas involucradas en la longevidad, se ve afectado en presencia de esta enzima por dos mecanismos:

- 1) SIRT1 aumenta la capacidad de foxo3 para parar el ciclo apoptótico y la resistencia al estrés.
- 2) SIRT1 inhibe la capacidad para inducir la muerte celular mediada por foxo3.

Por otra parte, limitar las calorías también causa la interacción de SIRT1 con el PPAR gamma coactivador -1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ). SIRT1, una vez es inducida, desacetila a PGC-1  $\alpha$  en residuos de lisina de manera dependiente de NAD<sup>+</sup>, éste se traslada al núcleo y se une al factor nuclear respiratorio 1 (NRF-1) y activa la transcripción de genes mitocondriales y, por tanto, la biogénesis mitocondrial. Esta biogénesis favorece la disminución en el daño a macromoléculas y ADN de células. PGC-1 $\alpha$  es el centro de una red compleja de señales afectada por factores metabólicos, nutricionales y ambientales que modulan, por modificaciones transcripcionales y post transcripcionales. (Vega et al., 2000; Guarente, 2011; Langley et al., 2002; Motta et al., 2004). FOXO3a es un factor de transcripción importante en la regulación de la expresión de SIRT1, ya que se necesita de la interacción física de FOXO3a con p53 para que, en condiciones de RC, se promueva la unión dentro del promotor de SIRT1.

Otro ejemplo de molécula regulada en la RC es P16, proteína inhibidora de quinasas dependientes de ciclinas (CDK4, CDK6) y supresora de tumores, codificada por el gen *CDKN2A*. P16 inhibe el ciclo celular y se acumula durante el envejecimiento. Funciona, principalmente, como regulador de la vía pRb / E2F (Figura 14). La represión de dicho gen viene dada por el silenciamiento epigenético directo de la remodelación de la cromatina por la metilación en el promotor del gen y la actividad de desacetilación de SIRT1; y, además, por un mecanismo epigenético indirecto como es la interacción con la vía de señalización de Akt / p70S6K1, lo que resulta en la progresión del ciclo celular, dando lugar a un aplazamiento en la senescencia y longevidad (Li & Tollefsbol, 2011). Es frecuente la hipermetilación (y silenciamiento) del gen supresor tumoral *p16* en varios tipos de tumores, al igual que ocurre con el gen *Ras* (Hass et al., 1993). En este sentido, la vía de la metilación del ADN puede controlar genes relacionados con el cáncer clave durante RC, lo que sugiere también una estrecha relación entre el envejecimiento y el cáncer (Li & Tollefsbol, 2011).

También existen indicios de que la proteína de reparación ku70 humana, puede llegar a ser desacetilada por SIRT1 e inactivar el factor proapoptótico Bax, inhibiendo la apoptosis (Cohen et al., 2004).



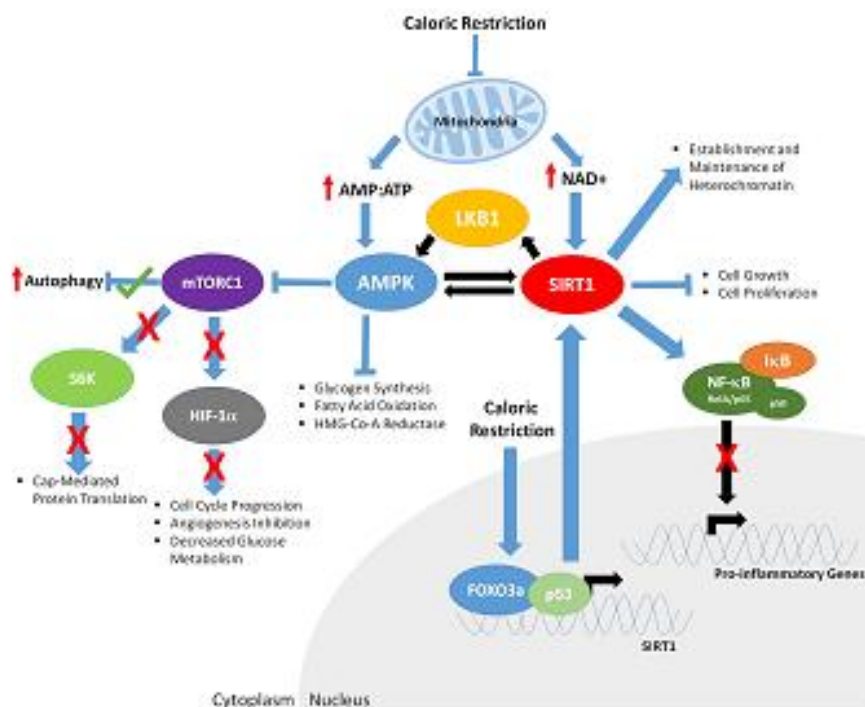
**Figura 14.** E2F en ausencia de estímulos mitóticos se encuentra inactivo por su unión con la proteína retinoblastoma (pRb) y el ciclo celular se mantiene en G1 y se detiene la proliferación.

Las quinasas CDK4, CDK6 y CDK2 se encargan de fosforilar a pRb, pero requieren de las proteínas reguladoras, denominadas ciclinas D y E, para su actividad.

Los factores de crecimiento estimulan la producción de ciclinas y estas se unen a sus CDK respectivos favoreciendo la fosforilación de pRb y la liberación de E2F y, por tanto, la célula prolifera.

Como hemos comentado, además de la vía de las sirtuinas, existen otras vías de señalización implicadas en el efecto beneficioso de la RC sobre la longevidad.

Cuando se aumenta la p16 se inhiben las quinasas deteniendo la proliferación celular



**Figura 15.** Rutas implicadas en los efectos de la RC (Gillespie et al., 2016).

## **Vía insulina/IGF-1 (IIS)**

El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa es regulado por el hígado y por las células  $\beta$  pancreáticas, en respuesta al cambio de nutrientes. Durante el ayuno los hepatocitos inducen la gluconeogénesis para suministrar glucosa a los tejidos. Se ha revelado que la respuesta al aumento de glucosa se encuentra bajo control de la actividad SIRT1. Además, SIRT1 participa en la regulación positiva de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa a través de la represión de la proteína UCP-2. Esto se ha observado en ratones en los que tienen disminuida la expresión de UCP-2, cuyos niveles de ATP y secreción de insulina en respuesta a la glucosa en las células  $\beta$  están disminuidos. La regulación de UCP2 por SIRT1 también puede ser un eje para contribuir a la diabetes inducida por obesidad (Bordone et al., 2005).

Los nutrientes pueden activar diferentes vías de forma directa o indirecta. Éstos aumentan el nivel de insulina e IGF1, que activan rutas pro-envejecimiento y participan en enfermedades asociadas al envejecimiento, mientras que RC contrarresta sus efectos. SIRT1 regula la producción de insulina y de IGF-1 y, a la inversa, estas dos moléculas regulan, a su vez, la producción de SIRT1. Como ya se ha visto en el apartado anterior, una de las proteínas más importantes relacionada con la senescencia celular es la p53 que, a su vez, es regulada negativamente por SIRT1. Pues bien se ha estudiado la vía de señalización IGF-1-SIRT1-p53 y se ha llegado a la conclusión de que un aumento de IGF-1 prolongado inhibe a SIRT1, a través de la señalización PI3K, lo que resulta en un aumento de la acetilación y estabilización de p53 que implica una senescencia celular prematura (Tran et al., 2014).

Las mutaciones observadas en genes de mamíferos que regulan negativamente la vía de la insulina/IGF-1 aumentan la longevidad, como es el caso de los ratones enanos, que presentan mutaciones en el receptor de la hormona hipofisaria del crecimiento (GH). Gracias a una mutación puntual en el gen Pit-1, estos ratones ven incrementada su longevidad en un 40% con respecto a los controles, además de presentar bajos niveles plasmáticos de insulina, IGF-1 y glucosa (Brown-Borg et al., 1996).

## **Vía de mTOR**

La proteína mTOR (mammalian target of rapamycin), es una serin-treonin-quinasa que está involucrada en diversos procesos como el crecimiento, motilidad, proliferación, transcripción y traducción en células. La inhibición de esta vía hace que la esperanza de vida se alargue y confiere protección contra una serie de patologías relacionadas con la edad. mTOR presenta dos complejos:



- 1) mTORC1 o “raptor” (target of rapamycin complex 1), complejo sensible a la rapamicina, que se encarga de regular rutas implicadas en la traducción del ARNm, en la autofagia y en otras respuestas celulares, en concreto en el crecimiento y diferenciación. Regula el crecimiento celular a través de efectores tales como S6K1 y 4E-BP1.
- 2) mTORC2 o “rictor” (target of rapamycin complex 2), es un complejo insensible a la rapamicina que regula componentes del citoesqueleto y la señalización de la insulina mediante la fosforilación de la quinasa Akt / PKB.

Asociados, mTORC1 y mTORC2 estimulan el crecimiento celular y la proliferación mediante la inhibición de las vías de mantenimiento celular, tales como la autofagia (mecanismo que permite la adaptación de las células a condiciones de estrés, así como la eliminación de macromoléculas dañadas, orgánulos citoplasmáticos potencialmente dañinos, incluyendo las mitocondrias defectuosas) y la estimulación global de la síntesis proteica.

mTOR puede ser activado de maneras distintas, una de ellas es con la presencia de aminoácidos tales como la leucina. mTORC1 es el complejo encargado de activar, mediante la fosforilación de la quinasa S6 o S6K1, la traducción de las proteínas. SIRT1 inhibe a mTOR a través de una interacción con el complejo TSC1-TSC2, genes supresores de tumores (caracterizados en diversos tumores), con la consiguiente inhibición de mTORC1. Al encontrarse inhibido mTORC1, no se lleva a cabo la fosforilación de S6K. AMPK, un sensor de energía celular, también actúa como regulador negativo de la vía mTOR en respuesta al estrés energético (figura 15). Por ello, mTOR se muestra como un buen candidato a la farmacología en la intervención para retrasar el proceso de envejecimiento y la aparición de trastornos relacionados con la edad. De hecho, se ha comprobado que la rapamicina retrasa la senescencia celular (Johnson et al., 2013; Hay et al., 2011; Feldman et al., 2009; Mcburney et al., 2010).

### **Vía de AMPK**

La serin-treonin-quinasa activada por AMP (AMPK) es un complejo heterotrimérico que se activa con el incremento en la relación AMP/ATP en la célula, por lo que se considera un sensor de energía celular y regulador clave del balance energético y la ingesta calórica mediante el control del metabolismo de glucosa y lípidos. Por ello, se considera una enzima importante a la hora de buscar posibles tratamientos de enfermedades relacionadas con el metabolismo como la obesidad, la diabetes mellitus 2 o la esteatosis hepática. La AMPK está

presente en la mayoría de los órganos incluyendo el hígado, músculo esquelético, corazón, hipotálamo e incluso en las células adiposas.

La AMPK se activa por una serie de estímulos entre los que se encuentran ausencia de glucosa, ejercicio, hipoxia, isquemia, estrés oxidativo y estrés hiperosmótico. Si los niveles de ATP son bajos, como ocurre en la RC, AMPK se activa a través de la LKB1, que es un sustrato de SIRT1. Una vez que la vía se encuentra activada, aumenta la síntesis de ATP mediante rutas catabólicas y se inhiben las rutas anabólicas por las que se consume ATP, regulando así el balance energético. La AMPK activada conduce a la fosforilación y activación del complejo TSC1- TSC2 (como ya se explicó en el apartado anterior) con la respectiva inhibición de mTORC1. Además, la vía de LKB1-AMPK fosforila y activa p27, inhibidor de quinasas dependientes de ciclina, que conduce a la detención del ciclo celular, que es esencial para evitar la apoptosis e inducir la autofagia para la supervivencia en respuesta al estrés bioenergético durante la privación calórica (Yokoyama et al.,2015).

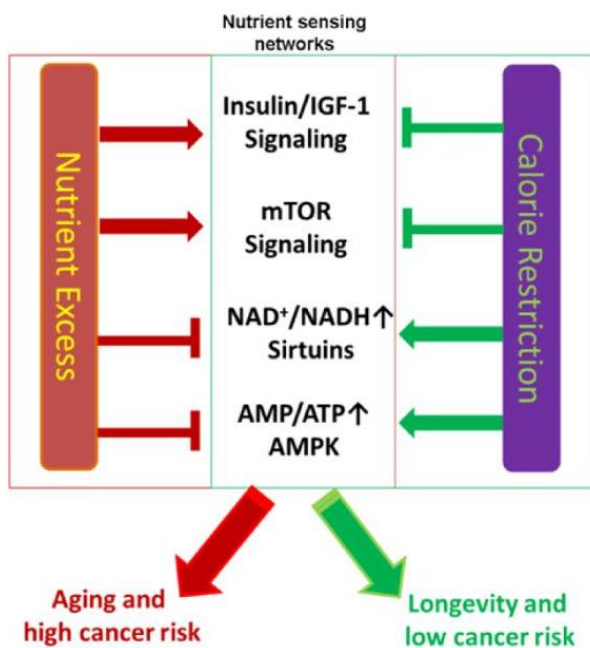


Figura 16. El efecto de las condiciones restrictivas en exceso y calóricas de nutrientes sobre la longevidad y el riesgo de cáncer a través de las redes de señalización de detección de nutrientes (Yokoyama, 2015).

#### 4.2. MIMÉTICOS DE RC (CRM)

Un número de compuestos de la dieta que imitan los efectos de la CR proporcionan evidencia de que los factores nutricionales pueden ser clave para extender la longevidad celular y mejorar algunas patologías asociadas. Los polifenoles son los compuestos más estudiados en lo que respecta a agentes modificadores del epigenoma. En general, se consideran agentes

anticancerígenos por activar la expresión de genes supresores de tumores, existiendo numerosos estudios sobre líneas celulares cancerosas que apoyan esta hipótesis.

### **RESVERATROL**

Uno de los CRM más estudiados es el resveratrol (RSV), un polifenol aislado del eléboro blanco (*Veratrum grandiflorum*), aunque también se encuentra en las uvas, algunos frutos secos como las nueces, cereales, te y cacahuets. Es conocido por sus efectos beneficiosos en relación con el envejecimiento. El RSV actúa como activador de la sirtuina-1 (SIRT1), pero también como inhibidor de las DNMTs, por lo que se considera que juega un papel importante en el envejecimiento.

El RSV fue identificado por primera vez en un cribado de bibliotecas moleculares de compuestos que activan a las sirtuinas para extender la esperanza de vida en *Sacharomyces cerevisiae*. En ese mismo estudio, demostraron que el RSV puede imitar los beneficios asociados con la RC y, posteriormente, según estudios en otras especies se demostró que extendía la longevidad de las mismas. Se sabe que bajas dosis de RSV contribuyen a la mejora de enfermedades relacionadas con la edad, tales como diabetes, cáncer o el propio envejecimiento. Parece ser que, a bajas concentraciones, el RSV exhibe funciones biológicas de una manera dependiente de SIRT1. Sin embargo, un estudio reciente mostró que el polifenol no tuvo efecto sobre la longevidad de los ratones alimentados con una dieta normal. Aunque el efecto de extender la longevidad de los seres vivos todavía no es del todo seguro, se acepta que puede mejorar la salud y prevenir las enfermedades relacionadas con la edad. Aun así, se requieren más investigaciones y aclaraciones para verificar si estamos ante un verdadero CRM (Howitz et al., 2003; Sun et al., 2007; Martin et al., 2013).

### **TÉ VERDE**

El EGCG (galato-3-epigallocatequina) está presente en el té verde y se considera el compuesto dietético con más poder inhibitorio sobre la actividad de DNMT. EGCG interacciona de forma directa con DNMT, impidiendo la adición de grupos metilo en promotores determinados de genes supresores de tumores y favoreciendo, por tanto, su expresión. Además de actuar a nivel de la metilación del ADN, este compuesto actúa como inhibidor de las acetilasas de histonas (HATs) y como modulador de la expresión de los miARNs, favoreciendo la expresión de genes supresores de tumores e inhibiendo la de los oncogenes (Garaulet et al., 2013; Gillespie et al., 2016).

## **CURCUMINA**

Se trata de otro polifenol que se encuentra en la planta *Curcumina longa* que es usado como colorante en los alimentos. Podemos encontrarlo también en moras, soja o en la yema de huevo. Presenta efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antiangiogénicos y anticancerígenos. Parece ser que los efectos sobre el epigenoma de la curcumina se deben a la interacción covalente con el sitio catalítico de DNMT1 bloqueando su actividad con la respectiva hipometilación del ADN.

También actúa a nivel de la acetilación de histonas tanto como inhibidor de HAT como de HDAC, lo que indicaría un proceso gen o tejido específico que hace que se trate de una molécula importante para la investigación en tratamientos de enfermedades. Al inhibirse HAT podrían quedar silenciados protooncogenes o genes proinflamatorios y al inhibirse HDAC, deja vía libre a HAT para incorporar los grupos acetilo en las histonas con la seguida activación de genes supresores de tumores beneficiosos para la salud (Garaulet et al.,2013).

## **RAPAMICINA**

La rapamicina, es un macrólido aislado a partir de *Streptomyces hygroscopicus*, encontrado en el suelo de la Isla de Pascua. La rapamicina o sirolimus es un agente farmacológico que es clásicamente usado como inmunosupresor para evitar rechazos en trasplantes. Esta molécula es un inhibidor específico de mTOR, que crea un complejo trimolecular entre la quinasa mTOR y la proteína citosólica FKBP12, inactivando a mTORC1 produciendo el mismo efecto que la RC. Además de retrasar la proliferación de muchas líneas celulares de cáncer (se inhibe la progresión celular y aumenta la autofagia) presenta propiedades anti-angiogénicas. No obstante, existe cierta incertidumbre sobre la medida en la que el genoma humano es modificado por la rapamicina, puesto que hay estudios contradictorios. Así mientras que en fibroblastos humanos tratados con rapamicina durante 5 días se observaron cambios en la expresión de numerosos genes, en estudios realizados en tejido adiposo blanco del epidídimo de ratones tratados con rapamicina durante 6 meses no se observaron estos cambios, lo que podría indicar que la respuesta de la rapamicina es específica según el tipo de célula o especie, que es dependiente del tiempo o, incluso, que las células se habitúan y no responden igual con el paso del tiempo (Gillespie et al., 2016).

## **METFORMINA**

La metformina es un fármaco antidiabético muy usado en diabetes mellitus 2. El mecanismo de la metformina radica en la reducción de la producción de glucosa hepática, el aumento de

la sensibilidad a la insulina, la disminución de la lipólisis en los adipocitos y la absorción intestinal de glucosa (Yokoyama et al., 2015). En Febrero de este año (2017), Federico Pietrocola y Guido Kroemer, investigadores del Instituto del Cáncer Gustave Roussy en Francia ponen en pie la capacidad de la metformina para inhibir la biosíntesis de acetyl-CoA que reduce la posibilidad de acetilación de las histonas y el silenciamiento de dichos genes (Pietrocola & Kroemer, 2017). La metformina activa AMPK y SIRT1, similar a como lo hace la RC. Asimismo, en determinados estudios se ha evidenciado el papel protector de la metformina frente a cánceres (cáncer de colon o de ovario) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Yokoyama et al., 2015); su implicación en la reducción de la inflamación mediante la represión del factor NF- $\kappa$ B a través de SIRT1; y la disminución del estrés oxidativo por la activación de la vía AMPK y la desacetilación de p53 mediada por SIRT1. En base a los diferentes mecanismos utilizados por la metformina, es evidente su papel en la mejora de la salud y la longevidad (Gillespie et al., 2016).

## **5. CONCLUSIONES**

Es evidente que la dieta es un factor determinante en la salud del individuo. Tanto es así, que en los distintos estudios realizados en especies animales, incluso en humanos (CALERIE), y numerados a lo largo de este trabajo, apoyan la idea de que la RC no sólo mejora ciertas patologías, como la diabetes o el cáncer, sino que actúa, a diferencia de otros métodos o tratamientos, directamente sobre los mecanismos específicos del envejecimiento. La RC utiliza para ello las vías de detección de nutrientes de las sirtuinas, del AMPK, de mTOR o la vía de la insulina/IGF-1. Estas vías se encuentran interconectadas gracias a la actividad de SIRT1, una desacetilasa que adquiere especial relevancia en los posibles mecanismos de acción de la RC, ya que es la responsable de modificaciones epigenéticas en histonas, lo que genera cambios en la expresión de algunos genes. La activación, a través de la RC, de las vías de las sirtuinas y del AMPK con la inactivación paralela de las vías de mTOR y de la insulina/IGF-1 retrasa el envejecimiento, e incluso disminuye los procesos asociados a algunos cánceres, ya sea por la propia modificación de genes supresores u oncogenes, como por ejemplo p16, o mediante la inactivación de procesos característicos de tumores como la apoptosis mediada por los factores proapoptóticos p53, FOXO o Bax. Las principales acciones bioquímicas de la RC que corroboran su implicación en el aumento de la longevidad son: la disminución del daño causado por el estrés oxidativo en las células, la degradación por autofagia de residuos celulares dañados, la estimulación de la síntesis proteica global, la activación de la biogénesis mitocondrial y la mejora en la sensibilidad a la insulina. Todos estos cambios también se

observan con los llamados miméticos de la RC (MRC), compuestos como algunos polifenoles (resveratrol, EGCG y curcumina), la rapamicina o la metformina.

Aunque queda todavía mucho trabajo de investigación para encontrar el "*elixir de la eterna juventud*", podemos concluir que la RC supone una buena estrategia preventiva en el envejecimiento y patologías asociadas al mismo. Asimismo, la RC da cabida al estudio de futuras líneas de investigación en busca de nuevos tratamientos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walte P. *Biología molecular de la célula*. 5ª ed. Nueva York: Garland ciencia; 2008.
- Anton S, Leeuwenburgh C. Fasting or caloric restriction for healthy aging. *Exp. Gerontol.* 2013; 48: 1003-1005.
- Ascencio Téllez N, Cerbón MA, Cervantes A, López M, Rodríguez Dorantes, M. Rev. DNA methylation: an epigenetic process of medical importance. *Rev Invest Clin.* 2004; 56 (1): 56-71.
- Bacalini MG, Friso S, Olivieri F, Pirazzini C, Guilianni C, Capri M, Santoro A, Franceschi C, Garagnani P. Present and Future of Anti-Ageing Epigenetic Diets. *Mech Ageing Dev.* 2014; 136-137: 101–115.
- Bagot RC, Zhang TY, Wen X, Nguyen TT, Nguyen HB, Diorio J, Wong TP, Meaney MJ. Variations in postnatal maternal care and the epigenetic regulation of metabotropic glutamate receptor 1 expression and hippocampal function in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109 Suppl 2: 17200–17207.
- Bales CW, Kraus WE. Caloric restriction: implication for human cardiometabolic health. *J Cardiopulm Rehabil Prev.* 2013; 33(4): 201-208.
- Biosphere 2 [en línea]. [Consultado en Abril 2017]. Disponible en: <http://biosphere2.org/>
- Bitterman K, Anderson R, Cohen H, Latorre-Esteves M, Sinclair D. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem.* 2002; 277(47): 45099-45107.
- Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A, Easlson EJ, Lin SJ, Guarente L. Sirt1 Regulates Insulin Secretion by Repressing UCP2 in Pancreatic  $\beta$  Cells. *PLoS Biol.* 2006; 4(2): e31.
- Brian D, Cavnagari M. Regulación de la expresión génica: cómo operan los mecanismos epigenéticos. *Arch Argent Pediatr.* 2012; 110(2): 132-136.
- Brown-Borg H, Borg K, Meliska C, Bartke A. Dwarf mice and the ageing process. *Nature.* 1996; 384(6604): 33.
- CALERIE [en línea]. [Consultado en Abril 2017]. Disponible en: <https://calerie.duke.edu/>
- Cantó C, Auwerx J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20(7) 325–331.
- Carey, N. *La revolución epigenética*. 1ª ed. Intervención Cultural; 2013.

- Cauwenberghe CV, Vandendriessche C, Libert C, Vandenbroucke RE. Caloric Restriction: Beneficial Effects on Brain Aging and Alzheimer's disease. *Mamm Genome*. 2016; 27(7-8): 300-319.
- Chaudry SF, Timothy J, Chevassut T. Epigenetic Guardian: A Review of the DNA Methyltransferase DNMT3A in Acute Myeloid Leukaemia and Clonal Haematopoiesis. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 5473197.
- Chittka A, Chittka L. Epigenetics of Royalty. *PLoS Biol*. 2010; 8(11): e1000532.
- Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, Frye R, Ploegh H, Kessler BM, Sinclair DA. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 2004; 13(5): 627-638.
- Cromatina. [en línea]. [Consultado el 30 de Febrero de 2017] Disponible en: <http://resumencromatina.blogspot.com.es/?view=sidebar>
- Devlin, TM. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4ª ed. Barcelona: Reverté, S.A; 2015.
- Dolinoy DC. The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutr Rev*. 2008; 66 Suppl 1: S7-11.
- Ducasse M, Brown, MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer*. 2006; 5: 60.
- Duhl D, Vrieling H, Miller K, Wolff G, Barsh G. Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nat Genet*. 1994; 8(1): 59-65.
- Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet*. 2013; 29(10): 569-574.
- Ekamper P, van Poppel F, Stein AD, Bijwaard GE, Lumey LH. Prenatal Famine Exposure and Adult Mortality From Cancer, Cardiovascular Disease, and Other Causes Through Age 63 Years. *Am J Epidemiol*. 2015; 181(4): 271-279.
- Esteller, M. NO SOY MI ADN. Barcelona: RBA LIBROS; 2017.
- Feduchi Canosa E, Romero Magdalena C, Yañez Conde E, Blasco Castiñeyra I, García-Hoz Jiménez C. Bioquímica. Conceptos esenciales. 2ª ed. Editorial Médica Panamericana; 2015.
- Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat, KM. Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*. 2009; 7(2): e1000038.
- Fraga, M. Genetic and epigenetic regulation of aging. *Curr Opin Immunol*. 2009; 21(4): 446-453.



- Garaulet Aza M, Arroyo Hornero R, Gómez Abellán P. Capítulo 11: Epigenética y nutrición. En: García Luna PP, Pérez de la Cruz AJ. NUTRIENTES ESPECÍFICOS: Hacia una nutrición clínica individualizada. Grupo Aula Médica, SL; 2013.
- García Robles R, Ayala Ramírez PA, Perdomo Velásquez SP. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. Rev. Cienc. Salud. 2012; 10(1): 59-71.
- GeneticaMolecularUnLaR [en línea]. [Consultado en Febrero 2017]. Disponible en: <https://geneticamolecularunlar.wikispaces.com>
- Gillespie ZE, Pickering J, Eskiw CH. Better Living through Chemistry: Caloric Restriction (CR) and CR Mimetics Alter Genome Function to Promote Increased Health and Lifespan. Front Genet. 2016;7: 142.
- Guarente L. Sirtuins, aging, and metabolism. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2011; 76: 81-90.
- Guarente L, Liszt G, Haigis M, Ford E, Lin, SJ. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. Genes Dev. 2004; 18(1): 12-16.
- Hass B, Hart R., Lu M, Lyn-Cook B. Effects of caloric restriction in animals on cellular function, oncogene expression, and DNA methylation in vitro. Mutat Res. 1993; 295(4-6): 281-289.
- Hay, N. Interplay between FOXO, TOR, and Akt. Biochim Biophys Acta. 2011; 1813(11): 1965-1970.
- Henderson M. 50 cosas que hay que saber sobre genética. 2ª ed. Ariel; 2010.
- Holliday R. Epigenetics comes of age in the twenty first century. J Genet. 2002; 81(1): 1-4.
- Imai S, Armstrong C., Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional Silencing and Longevity Protein Sir2 Is an NAD-dependent Histone Deacetylase. Nature. 2000; 403(6771): 795-800.
- Isidoro García M. Molecular Genetics of Asthma. Nueva York : Springer; 2016.
- Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. Nature. 2013; 493(7432): 338-345.
- Juvé, N. Biomarcadores epigenéticos. En: Biomarcadores: Analítica, Diagnóstico y Terapéutica. Coord. Por Fidel Ortega. Monografía nº 30 de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2010: 85-112.
- Juvenal, GJ. Epigenética: vieja palabra, nuevos conceptos. Rev. argent. endocrinol. 2014; 51(2).
- Krause BJ, Castro Rodríguez JA, Uauy R, Casanello P. General concepts of epigenetics: Projections in paediatrics. Rev Chil Pediatr. 2016; 87(1): 4-10.

- Kucera GT, Bortner DM, Rosenberg MP. Overexpression of an Agouti cDNA in the Skin of Transgenic Mice Recapitulates Dominant Coat Color Phenotypes of Spontaneous Mutants. *Dev Biol.* 1996; 173(1): 162-173.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R. Nutritional control of reproductive status in honey- bees via DNA methylation. *Science.* 2008; 319(5871): 1827-1830.
- Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J.* 2002; 21(10): 2383-2396.
- Lardenoije R, van den Hove DL, Vaessen TS, Iatrou A, Meuwissen KP, van Hagen BT, Kenis G, Steinbusch HW, Schmitz C, Rutten BP. Epigenetic modifications in mouse cerebellar Purkinje cells: Effects of aging, caloric restriction, and overexpression of superoxide dismutase 1 on 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Neurobiol Aging.* 2015 ;36(11):3079-3089.
- Lee C, Longo V. Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging. *F1000Res.* 2016; 5: F1000.
- Li Y, Tollefsbol TO. p16INK4a Suppression by Glucose Restriction Contributes to Human Cellular Lifespan Extension through SIRT1-Mediated Epigenetic and Genetic Mechanisms. *PLoS One.* 2011; 6(2): e17421.
- Lin R, Sternsdorf T, Tini M, Evans R. Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene.* 2001; 20(49): 7204-7215.
- Lin S, Defossez P, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 2000; 289(5487): 2126-2128.
- Lin S, Kaeberlein M, Andalis de AA SL, Defossez PC, Fink G, Guarente L. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature.* 2002; 418(6895): 344-348.
- Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhay C, Maleszka R. The Honey Bee Epigenomes: Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers. *PLoS Biol.* 2010;8(11): e1000506.
- Martin S, Hardy T, Tollefsbol T. Medicinal Chemistry of the Epigenetic Diet and Caloric Restriction. *Curr Med Chem.* 2013; 20(32):4050–4059.
- McBurney M, Ghosh HS, Robbins PD. SIRT1 Negatively Regulates the Mammalian Target of Rapamycin. *PLoS One.* 2010; 5(2): e9199.
- McCay CM, Crowell MF, Maynard L. The effect of retarded growth on the length of life span and upon ultimate body size. *Nutrition.* 1989; 5(3): 155-171.
- Messaoudi I, Warner J, Fischer M, Park B, Hill B, Mattison J, Lane MA, Roth GS, Ingram DK, Picker LJ, Douek DC, Mori M, Nikolich-Zugich J. Delay of T cell senescence by caloric

- restriction in aged long-lived nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(51): 19448-19453.
- Morgan D, Whitelaw, E. The case of transgenerational eepigenetic inheritance in humans. *Mamm Genome*. 2008; 19(6): 394-397.
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L. Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors. *Cell*. 2004; 116(4): 551-563.
- National Institute of Health. NIH: Office of Strategic Coordination - The Common Fund [en línea]. [Consultado en Marzo 2017]. Disponible en: <https://commonfund.nih.gov/epigenomics/figure>
- Orengo F, Dorcas J. *Fundamentos de la biología molecular*. UOC; 2013.
- Pietrocola F, Kroemer G. Metformin: a metabolic modulator. *Oncotarget*. 2017; 8(6): 9017-9020.
- Poi MJ, Li J, Tsai, MD. The Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16INK4A and Relevance to Cancer. *Biochemistry*. 2011; 50(25): 5566-5582.
- Radler ME, Hale MW, Kent S. Calorie Restriction Attenuates Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Microglial Activation in Discrete Regions of the Hypothalamus. *Brain Behav Immun*. 2014; 38: 13-24.
- Rodríguez-Rodero S, Fernández-Morera JL, Menéndez-Torre E, Calvanese V, Fernández AF, Fraga MF. Aging Genetics and Aging. *Aging Dis*. 2011; 2(3): 186–195.
- Romá Mateo C. *La epigenética*. Madrid: La catarata; 2016.
- Rosenfeld RD, Zeni L, Welcher AA, Narhi LO, Hale C, Marasco J, Delaney J, Gleason T, Philo JS, Katta V, Hui J, Baumgartner J, Graham M, Stark KL, Karbon W. Biochemical, Biophysical, and Pharmacological Characterization of Bacterially Expressed Human Agouti-Related Protein. *Biochemistry*. 1998; 37(46): 16041-16052.
- Scientific American [en línea]. [Consultado en Febrero 2017]. Disponible en: <https://www.scientificamerican.com/article/molecular-machines-control-genes/>
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003; 425(6954): 191-196.
- Skinner MK, Mannikam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21(4): 214-222.
- Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab*. 2007; 6(4): 307-319.

- Szyf M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicol Sci.* 2007; 100(1): 7-23.
- Taormina G, Mirisola, MG. Longevity: Epigenetic and biomolecular aspects. *Biomol Concepts.* 2015; 6(2): 105-117.
- Tran D, Bergholz J, Zhang H, He H, Wang Y, Zhang Y, Li Q, Kirkland JL, Xiao ZX. Insulin-like growth factor-1 regulates the SIRT1-p53 pathway in cellular senescence. *Aging Cell.* 2014; 13(4): 669-678.
- Tupler R, Perini G, Green MR. Expressing the human genome. *Nature.* 2001; 409(6822): 832-833.
- Van Speybroeck, L. From epigenesis to epigenetics: The case of C. H. Waddington. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 981: 61-81.
- Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(5): 1868–1876.
- Waddington C. The epigenotype. *Int J Epidemiol.* 2012; 41(1): 10-13.
- Willcox D, Willcox B, Todoriki H, Suzuki M. The Okinawan diet: health implications of a low-calorie, nutrient-dense, antioxidant-rich dietary pattern low in glycemic load. *J Am Coll Nutr.* 2009; 28 Suppl: 500S-516S.
- Yokoyama NN, Denmon A, Uchio EM, Jordan M, Mercola D, Xiaolin Z. When Anti-Aging Studies Meet Cancer Chemoprevention: Can Anti-Aging Agent Kill Two Birds with One Blow?. *Curr Pharmacol Rep.* 2015; 1(6): 420–433.