

**TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS DE LA
SALUD**

**PAPEL DEL COMPLEJO NLRP3-
INFLAMASOMA Y LA DIETA EN EL
ENVEJECIMIENTO Y LAS
ENFERMEDADES
CARDIOVASCULARES**



**Facultad de Odontología
Departamento de Estomatología**

**DIEGO CAÑADAS LOZANO
Sevilla, 2019**

**PAPEL DEL COMPLEJO NLRP3-INFLAMASOMA Y LA
DIETA EN EL ENVEJECIMIENTO Y LAS
ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES**

AUTOR

Diego Cañadas Lozano

DIRECTORES

PEDRO BULLÓN FERNÁNDEZ

MARIO DAVID CORDERO MORALES

ELISA ISABEL ALCOCCER GÓMEZ

Doctorado en Ciencias de la Salud

Departamento de estomatología

Universidad de Sevilla

2019

Dr. Pedro Bullón Fernández, catedrático del Departamento de Estomatología en la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla, **Dr. Mario David Cordero Morales**, docente del Departamento de Fisiología en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada y **Dra. Elisa Isabel Alcocer Gómez**, docente del Departamento de Psicología Experimental en la Facultad de Psicología de la Universidad de Sevilla, HACEN CONSTAR:

Que el trabajo presentado por D. Diego Cañadas Lozano con el título “**PAPEL DEL COMPLEJO NLRP3-INFLAMASOMA Y LA DIETA EN EL ENVEJECIMIENTO Y LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES**”, ha sido realizado bajo nuestra dirección como trabajo de investigación para el desarrollo de la tesis doctoral dentro del programa de doctorado en Ciencias de la Salud de la Universidad de Sevilla cursado por el interesado. Cumpliendo con los requisitos para su presentación.

Fdo. Pedro Bullón Fernández

Fdo. Mario David Cordero Morales

Fdo. Elisa Isabel Alcocer Gómez

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Dr. Pedro Bullón Fernández, Dr. Mario D. Cordero Morales y Dra. Elisa Isabel Alcocer Gómez, que han compartido sus conocimientos y experiencia conmigo, dedicando su tiempo y trabajo a la supervisión, guía y realización de este trabajo.

A mi familia, en especial a mis padres y hermana, por inculcarme unos valores y brindarme una educación que me permiten llegar a la consecución de mis objetivos, por guiarme y acompañarme en el transcurso de cada etapa y por ser un ejemplo a seguir.

A mis compañeros de investigación, Dra. Fabiola Marín Aguilar, Dr. Luis Pavillard Rodríguez, Dra. Lourdes Román Malo, que han sido un apoyo en el transcurso de este trabajo y sin cuya colaboración no habría podido llevarlo a cabo.

A mis amigos, por ese interés constante en los avances del trabajo, por ser parte del mismo participando en cada uno de los momentos de descanso.

A mi pareja, Isabel, por el apoyo incondicional y constante, por compartir y dedicar su tiempo a mi causa, por la compañía, espera paciente y comprensión infinita dando sentido a los esfuerzos diarios.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. NUTRICIÓN

- 1.1 Nutrición humana y salud.....11
- 1.2 Recomendaciones dietéticas y nutricionales. Dietas.....13
- 1.3 Grasas en la dieta.....16
- 1.4 Malnutrición: Dietas hipercalóricas en países desarrollados, influencia en la salud y patologías inflamatorias.....17
- 1.5 Nutrición y obesidad.....19
- 1.6 Influencia en la salud y consecuencias clínicas de la obesidad:22
 - Estrés oxidativo, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico, patología cardiovascular
- 1.7 Tratamiento para la obesidad.....26

2. ENVEJECIMIENTO

- 2.1 Conceptos y bases del envejecimiento.....27
- 2.2 Teorías de envejecimiento.....31
- 2.3 Características del envejecimiento.....35
- 2.4 Genética y vías del envejecimiento.....37
- 2.5 Telómeros.....41
- 2.6 Efecto de la dieta en el envejecimiento.....41
- 2.7 Autofagia y envejecimiento.....43
- 2.8 Terapias antienvjecimiento.....50

<u>3. ENVEJECIMIENTO CARDIOVASCULAR</u>	
3.1 Sistema cardiovascular.....	51
3.2 Enfermedades cardiovasculares y daño cardiaco.....	52
3.3 Envejecimiento del sistema cardiovascular.....	54
3.4 Dieta, envejecimiento cardiaco e inflamación.....	56
3.5 Obesidad y daño cardiaco.....	58
<u>4. INFLAMACIÓN Y PATOLOGÍAS INFLAMATORIAS. INFLAMASOMA</u>	
4.1 Sistema inmune.....	60
4.2 Inflamación.....	61
4.3 Complejo inflamasoma.....	64
4.4 Modulación de la autofagia e inflamasoma.....	70
<u>II. HIPÓTESIS DE ESTUDIO</u>	75
<u>III. OBJETIVOS</u>	77
<u>IV. MATERIAL Y MÉTODO</u>	79
<u>V. RESULTADOS</u>	87
<u>VI. DISCUSIÓN</u>	103
<u>VII. CONCLUSIONES</u>	111
<u>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	113

I. INTRODUCCIÓN

1. NUTRICIÓN

1.1 Nutrición humana y salud

La nutrición y los hábitos alimenticios tienen un papel fundamental en el mantenimiento de un buen estado de salud o, por contra, en la aparición de enfermedades en los seres vivos. Una adecuada nutrición permite que un organismo pueda obtener los mejores resultados de acuerdo a sus recursos y necesidades, previniendo o curando enfermedades relacionadas con la alimentación [1]. En sociedades occidentales actuales, la obesidad está convirtiéndose en un problema epidémico de salud pública, es por ello esencial darle un papel prioritario a la nutrición y su estudio. Los tipos de vida en estas sociedades desarrolladas, industrializadas, con dietas occidentales, están alejándose de una alimentación sana, consciente y regular, con comidas poco saludables, rápidas y con exceso de grasas saturadas. Todo ello, unido al estrés, sedentarismo y hábitos poco saludables, restan bienestar al organismo [2].

Se entiende por **nutrición** al conjunto de procesos y hábitos relacionados con la alimentación, permitiendo al organismo, mediante procesos de digestión y absorción, tomar la energía necesaria para poder llevar a cabo las funciones vitales y realizar actividades cotidianas. La **malnutrición**, no solo consiste en una nutrición deficiente, sino también puede deberse a un desequilibrio en la alimentación, ya sea por dieta pobre en general, de algunos nutrientes, o debido a una dieta con ingesta excesiva [3,4].

En el siglo XVIII comenzó el estudio científico de la relación entre dieta y salud. En los navegantes se veían enfermedades carenciales por sus dietas pobres y monótonas durante meses en el mar. Los primeros estudios al respecto se relacionaban con enfermedades debidas a déficit nutricional extremo de algún nutriente, estos problemas se producían de forma rápida y desaparecían al administrar los alimentos de los que habían estado carentes. Siendo fáciles de reproducir y estudiar en el campo experimental de laboratorio. Algunas de estas enfermedades eran el escorbuto, beriberi y pelagra. Lind realizó el primer ensayo clínico científico sobre el uso de cítricos en el tratamiento del escorbuto [5].

En los países desarrollados, han desaparecido, casi por completo, las enfermedades por carencias nutricionales. Es por ello que, en los estudios actuales, el interés se centra en

analizar la relación entre hábitos alimentarios y la salud, en relación a enfermedades crónicas como las cardiovasculares, diabetes tipo 2, obesidad y síndrome metabólico entre otras. Estas enfermedades están relacionadas con un exceso de grasa o energía en la dieta.

Dieta y salud durante el desarrollo de la especie humana

La especie humana es omnívora, nuestros antecesores tenían una dieta omnívora pero gran parte de la dieta se componía de alimentos vegetales. Hace 50000 años, en el Paleolítico, se introdujeron de forma progresiva los alimentos animales. Con el desarrollo de la especie humana y el desarrollo de herramientas para poder cazar, los alimentos mayoritariamente vegetales fueron sustituyéndose por alimentos de origen animal, pero aún con poco contenido graso, como es la carne de caza magra. Desde hace 10000 años (Mesolítico y Neolítico), comienza la domesticación de animales y desarrollo de la agricultura, teniendo una dieta caracterizada por menos proteínas de origen animal y más hidratos de carbono procedentes de la agricultura, apareciendo algunas enfermedades crónicas y carenciales.

Nuestros genes, preparados para épocas de escasez alimentaria y corta esperanza de vida, no han tenido tiempo para evolucionar hasta la situación actual de sedentarismo e ingesta calórica excesiva durante una vida más prolongada, por lo que los genes cuya interacción con la dieta y el medio ambiente favorecían la supervivencia del individuo hasta hace unos 100 años, hoy pueden actuar facilitando que aparezcan enfermedades como obesidad, diabetes e hipertensión. La preferencia del hombre por alimentos ricos en grasas y proteínas, es una herencia de la programación genética que nos hacía tomar aquellos alimentos que nos dieran más posibilidades de supervivencia, lo cual provoca ahora un compromiso para nuestra salud y longevidad.

En las últimas décadas, el gran aumento en la esperanza de vida, también ha conllevado la aparición de enfermedades degenerativas. Estas enfermedades, al aparecer en edades superiores a la reproductiva, tienen poca influencia genética en las generaciones posteriores, con poca adaptación evolutiva a las mismas, no se transmiten aquellas posibles ventajas genéticas a las enfermedades degenerativas entre individuos ya que se dan a edades tardías para la reproducción.

Actualmente, en las sociedades desarrolladas, con abundancia de alimentos, los hábitos alimentarios se asocian a aparición de enfermedades crónicas. Toda la dotación

genética del ser humano, seleccionada para favorecer la supervivencia en periodos de hambruna, se torna perjudicial, favoreciendo el desarrollo de enfermedades como obesidad, diabetes tipo 2 y patologías cardiovasculares [6].

1.2 Recomendaciones dietéticas y nutricionales. Dietas

Existen numerosos tipos de hábitos alimentarios y dietas en función de la cultura y región que estudiemos. Nos centraremos en la **dieta mediterránea** característica de los países de la cuenca mediterránea y en la **dieta de los países occidentales desarrollados** (dietas occidentales). Cada vez más, en los últimos tiempos, se está perdiendo el seguimiento de una dieta mediterránea en zonas de la cuenca mediterránea, tendiendo al cambio hacia una dieta occidental, con consecuencias para la salud.

a) Dieta de los países occidentales:

Predominante en países como EEUU, Inglaterra, norte y centro de Europa. Se caracteriza por:

- Alto consumo de féculas (patata) y productos de repostería con hidratos de carbono refinados y grasa animal o grasa hidrogenada.
- Consumo frecuente de carnes rojas (vaca, cerdo, cordero) y sus derivados (incluso más de 150 gr/día).
- Consumo elevado de productos lácteos, nata y mantequilla.
- Consumo escaso de frutas, hortalizas, cereales integrales y legumbres.
- Consumo de alcohol de forma episódica y concentrado en fines de semana.

Pese a relacionarse con buenos índices sanitarios (baja mortalidad infantil, talla elevada, poca incidencia de enfermedades infecciosas y baja frecuencia de epidemias) se asocia a incidencia muy alta de enfermedades crónicas como la cardiopatía isquémica (hasta 5 veces mayor que en países de la cuenca mediterránea) y distintos tipos de cáncer. Estudios epidemiológicos de japoneses emigrados a EEUU han demostrado un aumento de cardiopatía isquémica al emigrar de oriente a occidente y someterse a dietas occidentales [7] defendiendo que una dieta hipercalórica induce a patologías inflamatorias del tipo cardiopatía isquémica.

b) Dieta mediterránea:

Ancel Keys en los años 50 y 60 estudió en varios países occidentales la relación dieta – incidencia y mortalidad de la enfermedad coronaria (“El estudio de los 7 países”). Estudió los hábitos alimentarios en diferentes poblaciones y especialmente el consumo de grasa saturada, viendo que el incremento en este consumo, hacía aumentar el colesterol y desarrollo de problemas cardíacos. Sirvió para establecer la hipótesis dieta-corazón con un efecto beneficioso de la dieta mediterránea [8,9].

Keys caracterizó la dieta mediterránea con bajo consumo de carne y grasas animales, reemplazados por cereales y aceite de oliva.

Los hábitos alimentarios de la dieta mediterránea incluyen gran cantidad de legumbres, cereales, hortalizas, aceite de oliva, queso y, en menor cantidad, carne y salazones de pescado. Esta dieta ha ido cambiando hasta la actualidad por el acceso a productos típicos de una dieta occidental con más productos cárnicos y repostería industrial, disminuyendo el consumo de cereales y hortalizas, aumentando el de frutas, lácteos, aceite de oliva y otras grasas vegetales. Esto hace que la dieta mediterránea esté modificándose hacia patrones más similares a la dieta occidental convencional [10].

Características de la dieta mediterránea:

1. Elevado consumo de aceite de oliva (ácidos grasos monoinsaturados en vez de saturados). Es el rasgo más característico.
2. Elevado consumo de cereales (sobre todo pan), legumbres, frutas, hortalizas.
3. Bajo consumo de carne y derivados.
4. Consumo moderado de productos lácteos, vino y otras bebidas alcohólicas.

En los últimos tiempos, se ha incrementado la esperanza de vida en los países desarrollados, pero de forma simultánea también ha aumentando la prevalencia de enfermedades crónicas. La edad es un condicionante indiscutible, pero la dieta inadecuada y el sedentarismo juegan un papel fundamental en estas enfermedades.

La nutrición adecuada en el adulto, **dieta equilibrada o dieta saludable**, es definida como “aquella que aporta una cantidad adecuada y variada de alimentos, proporcionando los nutrientes cualitativa y cuantitativamente necesarios para el funcionamiento normal de nuestro organismo, en el momento actual y en el futuro”. Lo cual previene la aparición de enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición [11].

Aun así, los individuos que desarrollan enfermedades crónicas, suelen tener el mismo patrón alimentario que sus conciudadanos sanos, por lo que éstas aparecen por una compleja interrelación entre la susceptibilidad individual (predisposición genética) y el entorno (siendo la dieta un condicionante importante junto a otros factores).

Actualmente se considera que una **dieta adecuada** sería aquella que consiga el equilibrio entre el aporte de energía y nutrientes necesarios para evitar las enfermedades carenciales y que a su vez trate de prevenir las patologías crónicas/degenerativas debido a un exceso de nutrientes y calorías. Una disregulación de esta balanza conllevaría la aparición de enfermedades [Figura 1].

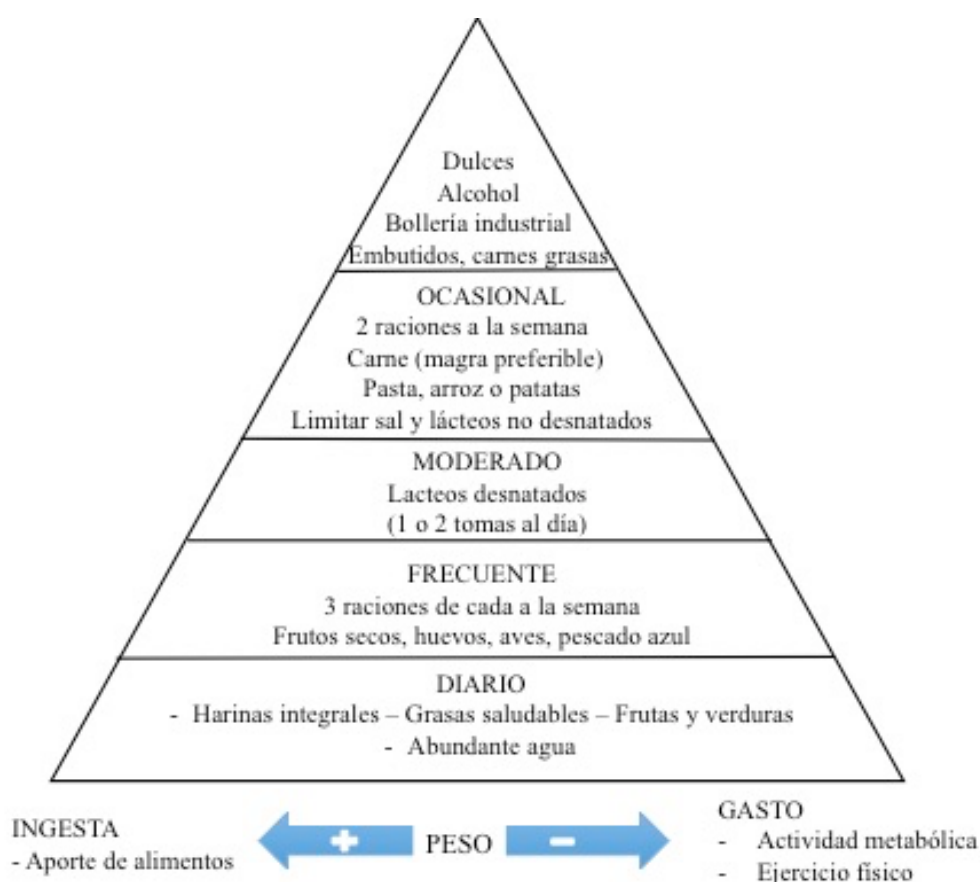


Figura 1. Pirámide nutricional y equilibrio energético.

Las recomendaciones nutricionales incluyen una ingesta diaria de frutas y verduras, grasas saludables (evitando las saturadas) y harinas integrales. Consumo frecuente de aves, pescados azules, huevos y frutos secos. Tomar con moderación lácteos, y a ser posible, desnatados. Ocasionalmente harinas refinadas, como son la pasta y el pan, mantequilla, carnes rojas y sal con moderación. Excepcionalmente tomar bollería industrial, chocolates, dulces, alcohol, embutidos y carnes grasas. Junto con todo ello,

es importante una buena hidratación con 2-3 litros de agua diarios [12].

1.3 Grasas en la dieta

Las grasas, son necesarias y fundamentales para una nutrición adecuada. Son ésteres en los que uno, dos o tres ácidos grasos se unen a una molécula de glicerina, formando mono, di o triglicéridos. El tipo más común son los triglicéridos, pudiendo estar formados por diferentes tipos de ácidos grasos. Éstos ácidos grasos son los que condicionan que, a temperatura ambiente, sean grasas sólidas o líquidas (aceites). Las grasas son insolubles en agua, con densidad inferior a la misma, y están presentes en el reino animal y vegetal. Cada gramo de grasa proporciona 9 kcal al metabolizarse, cumpliendo además función estructural y metabólica. Aportan a la dieta ácidos grasos esenciales, como el linoleico y el α - linolénico siendo vehículo de vitaminas liposolubles (A, D y E), además de favorecer la palatabilidad de la dieta. El problema aparece cuando las dietas se conforman con elevado contenido graso, marcando una dieta hipercalórica con alto poder obesogénico, generando una predisposición al desarrollo de obesidad y problemas metabólicos e inflamatorios.

Tipos de grasa

En función del tipo de ácidos grasos que las formen, valorando su grado de insaturación (enlaces dobles o triples), tenemos:

a) *Grasas saturadas*: Formadas mayoritariamente por ácidos grasos saturados. Sólida a temperatura ambiente. Elevan niveles plasmáticos de colesterol asociado a lipoproteínas LDL. La mayoría son de origen animal (tocino), pero también las hay de origen vegetal (aceite de coco y palma).

b) *Grasas insaturadas*: Formadas mayoritariamente por ácidos grasos insaturados como el oleico. Líquidas a temperatura ambiente, conocidas comúnmente como aceites (oliva, girasol, maíz). Son las más beneficiosas para el cuerpo humano, conteniendo ácidos grasos que son nutrientes esenciales. En su mayoría son de origen vegetal. Dentro de las grasas insaturadas tenemos:

- Grasas monoinsaturadas: Reducen niveles plasmáticos de colesterol asociado a las lipoproteínas LDL, evitando el efecto aterogénico. Las encontramos en aceite de oliva, aguacate, frutos secos. Elevan niveles de HDL.

- Grasas poliinsaturadas: Formadas por ácidos grasos de las series omega 3 y omega 6. Las formadas por las series omega 6 reducen niveles LDL y HDL [13], los de la serie omega 3 tienen menor efecto. Se encuentran en pescados azules, semillas y algunos frutos secos.

c) *Grasas Trans*: Obtenidas por hidrogenación de los aceites vegetales. Son más perjudiciales que las grasas saturadas naturales, elevando niveles LDL, descendiendo las HDL y con alto poder aterogénico.

En función de su procedencia podemos también clasificar las grasas en **origen animal, vegetal o grasas modificadas**. Las grasas animales son las obtenidas a partir de los depósitos adiposos de ciertos animales, siendo la manteca de cerdo la más utilizada, éstas han sido ampliamente utilizadas en estudios para generar una dieta hipercalórica alta en grasas.

La ingesta de **grasas saturadas** es el mayor determinante dietético de los niveles de colesterol-LDL, siendo este el factor de riesgo más importante para el desarrollo de enfermedad coronaria. En la prevención de la enfermedad cardiovascular durante el envejecimiento, estudios epidemiológicos han demostrado que es más importante el tipo de grasa consumida que la cantidad total ingerida. Es por ello que deben restringirse en casos de obesidad, diabetes y enfermedad cardiovascular [14,15].

1.4 Malnutrición. Dietas hipercalóricas en países desarrollados, influencia en la salud y patologías inflamatorias

La malnutrición puede originar enfermedades de muy diversos tipos. La primera evidencia experimental que permitió relacionar la dieta y las enfermedades fue la relación encontrada entre el escorbuto que presentaban los marinos embarcados y la escasez de frutas y verduras frescas de su dieta [5].

El papel de la nutrición humana en la salud pública constituye una de las grandes áreas de investigación y política sanitaria en los países desarrollados. Los patrones de enfermedad en estos países desarrollados han experimentado un profundo cambio de la mano de los patrones dietéticos y estilos de vida. La situación actual de abundancia de alimentos y sobreproducción está haciendo crecer la preocupación por la relación dieta-salud en estos países.

Alrededor de 1965, aparecieron evidencias que sugerían cómo enfermedades, que normalmente no se habían asociado con la nutrición, tenían también su origen en la misma. Un ejemplo evidente fue la cardiopatía isquémica, enfermedad considerada como una importante causa de mortalidad en muchas zonas del mundo.

Conforme se han realizado investigaciones sobre las bases fisiológicas y bioquímicas de enfermedades degenerativas crónicas se ha ido observando mayor relación entre la nutrición y las mismas. Actualmente, la **obesidad** tiene tal prevalencia a nivel mundial, sobre todo en estos países desarrollados, que constituye un importante problema de salud pública [2,16].

Tanto los excesos nutricionales, como las carencias, son objeto digno de estudio y tienen relación con procesos crónico degenerativos que suponen un coste elevado para los sistemas sanitarios. Debido a la notable diferencia en la disponibilidad alimenticia entre poblaciones de países desarrollados y aquellos en vías de desarrollo se ha observado una gran diferencia en la prevalencia de ciertas patologías entre ambas comunidades, existiendo en los países desarrollados más factores de riesgo dietéticos y nutricionales para el desarrollo de enfermedades degenerativas.

En los países en vías de desarrollo, las principales causas de enfermedad y muerte relacionadas con la nutrición se deben a una dieta de insuficiente valor calórico y nutrientes. Sin embargo, en los países desarrollados, las principales causas son las enfermedades degenerativas, caracterizadas por:

- Manifestaciones clínicas con aparición en la época media de la vida.
- Etiología múltiple.
- Relacionadas con dietas de elevado valor calórico y abundante contenido de alimentos de origen animal.

En el pasado, las enfermedades más comunes en los países occidentales eran agudas, sobre todo infecciosas, al igual que en los países en vías de desarrollo, solucionadas con tratamiento farmacológico. Sin embargo, tras los procesos de urbanización e industrialización en los países occidentales, se ha elevado la prevalencia de enfermedades degenerativas, cuya manifestación clínica se da en una fase avanzada del problema. En las últimas décadas, numerosos estudios se han centrado en el papel de la dieta, en conjunto o de alguno de sus componentes, en el desarrollo de enfermedades degenerativas [6,12,17].

1.5 Nutrición y obesidad

El problema de los cambios dietéticos y hábitos de vida poco saludables a los que estamos asistiendo se traduce en una mayor predisposición al desarrollo de obesidad, con lo que ello conlleva. La obesidad puede definirse como un “aumento de grasa corporal, traducida en un incremento de peso, por ingreso energético en la alimentación que supera el gasto calórico (balance de energía positiva) por un periodo de tiempo prolongado.” Actualmente, tiene tal prevalencia a nivel mundial, sobre todo en países desarrollados, que constituye un importante problema de salud pública [2]. Por este motivo, la OMS, la incluye dentro de las epidemias del siglo XXI.

Epidemiología

Respecto a su prevalencia, la obesidad es la enfermedad metabólica más prevalente del mundo occidental, siendo una de las causas principales del aumento de la morbimortalidad en los países desarrollados y constituyendo un grave problema de salud pública. En Europa, más de la mitad de los adultos de entre 35 y 65 años presentan sobrepeso o son obesos. La prevalencia de obesidad va en aumento en los países desarrollados, España está en un punto intermedio entre el norte de Europa, Francia y Japón, con las menores proporciones de obesos, y EEUU y los países del este europeo, con mayor número de casos.

El número de personas con sobrepeso en todo el mundo sobrepasa ya los 2.100 millones, aumentando los problemas de salud relacionados y teniendo una mayor morbilidad y mortalidad las personas que lo sufren [2,18,19].

A la hora de valorar la obesidad de un individuo, podemos analizar el IMC, dividiendo los kilogramos de peso por el cuadrado de la estatura en metros ($IMC = \text{peso [kg]} / \text{estatura [m]}^2$). Se consideran valores normales IMC entre 18-25. Sobrepeso entre 25-30, obesidad grado 1 entre 30-35 y obesidad grado 2-3 más de 35.

Respecto a la morbimortalidad, diversos estudios epidemiológicos han demostrado que personas con un $IMC > 27 \text{ kg/m}^2$ tienen riesgo relativo 70% mayor de padecer patologías relacionadas con la obesidad debido a los desórdenes metabólicos e inflamatorios que la acompañan, como son problemas cardiovasculares, infarto, diabetes mellitus tipo II y cáncer. Para considerar la obesidad como factor de riesgo, tiene que reunir la condición de aumento de peso y grasa corporal, así como incremento de morbimortalidad [20].

Etiología y factores relacionados a la aparición de obesidad

En la obesidad están implicados factores genéticos, endocrinos, neurológicos, psicológicos y ambientales en mayor o menor grado, siendo la base un desajuste crónico del balance energético por aumento en la ingesta y/o por disminución sistemática en el gasto de energía. Los factores ambientales como la excesiva comida ingerida y un estilo de vida sedentario son las principales causas de aparición de la enfermedad.

El incremento en la prevalencia de casos de sobrepeso y obesidad en el mundo entero se ha desarrollado a la par de una progresiva disminución de la energía gastada en las actividades laborales, tareas del hogar y necesidades diarias. Todo ello junto con el incremento de las **dietas ricas en grasas** y azúcares ha elevado la obesidad en la población. El cambio fundamental ha venido de factores del entorno humano ya que el genotipo humano no ha cambiado sustancialmente en las últimas décadas. Cambios en el día a día, como la aparición de máquinas que sustituyen tareas físicas a realizar tradicionalmente por los humanos pueden tener un importante impacto en el gasto total diario de energía consumida. Además de esta reducción del gasto energético por baja actividad física, se ha sumado una dieta que se traduce en mayor energía consumida, con exceso de grasa y comida hipercalórica. El consumismo ha favorecido la idea de necesitar grandes cantidades de comida, con grandes porciones e ingestas frecuentes. Todo ello unido al menor coste y facilidad al acceso y disponibilidad de comida en el día a día. De un modo u otro existe consenso en que el factor genético no es causa independiente de obesidad y es necesario la suma de otros factores.

Tejido adiposo y obesidad: El tejido adiposo como glándula endocrina

El tejido adiposo promueve la liberación de determinadas sustancias que actúan regulando funciones relacionadas con la ingesta y el metabolismo energético. Estas proteínas y moléculas que los adipocitos producen al diferenciarse pueden ser estudiadas al analizar un organismo. Las principales hormonas sintetizadas por el tejido adiposo son los estrógenos y andrógenos, los retinoides, el angiotensinógeno, la leptina, TNF- α y la adiponectina.

La **leptina** es producida por las células grasas del tejido adiposo blanco. Regula el apetito y el balance energético actuando sobre el centro de la saciedad, inhibiendo el apetito según la grasa corporal de reserva existente. Promueve el efecto inflamatorio y disminuye la sensibilidad a la insulina. Actúa sobre los núcleos hipotalámicos del

hambre y la saciedad, inhibiendo el primero y estimulando el segundo. Es la encargada del balance energético a medio y largo plazo, al aumentar la grasa, los adipocitos segregan leptina que llega al hipotálamo, uniéndose a los receptores correspondientes y dando señal de saciedad e inhibición del apetito, además de hacer aumentar el gasto energético. Sin embargo, en los humanos obesos los niveles de leptina plasmáticos están elevados hasta en 5 veces respecto a los individuos no obesos, pudiendo ser debido a una resistencia a nivel central a esta hormona y no a una falta en la producción de la misma (resistencia a la leptina) [21]. Además la administración de leptina en estos individuos no ha demostrado reducir la obesidad, en contraste a lo que ocurre en los modelos animales de laboratorio, por lo que los mecanismos que controlan el metabolismo y peso corporal en humanos son más complejos, necesitándose más investigaciones al respecto.

Los estudios de experimentación realizados han observado que la modificación de la magnitud de las reservas grasas (por control dietético, tratamiento quirúrgico o estado experimental de sobrealimentación) se traducen en cambios importantes de niveles circulantes de leptina pero en menor magnitud de lo esperado, por lo que aún falta por conocer todos los mecanismos y sustancias implicados en la regulación de la expresión y síntesis. Parecen existir otros factores moduladores de la expresión y síntesis de esta hormona [22, 23].

La **adiponectina** es una adipocitoquina secretada por los adipocitos, regula el metabolismo energético del organismo, ya que estimula la oxidación de ácidos grasos, reduce los triglicéridos plasmáticos y mejora el metabolismo de la glucosa mediante un aumento de la sensibilidad a la insulina. Además, inhibe las fases iniciales de la aterosclerosis, ya que reduce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, la transformación de macrófagos en células espumosas, la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF) y la proliferación de células de tejido muscular liso, disminuyendo el efecto inflamatorio.

Diferentes estados de resistencia a la insulina, como la obesidad y la diabetes tipo 2, o el desarrollo de enfermedades cardiovasculares se han asociado con una reducción de los valores de adiponectina plasmática. La cuantificación de la concentración de adiponectina plasmática podría permitir la caracterización de estos pacientes en función del riesgo de desarrollar complicaciones [24]. Asimismo, cualquier fármaco que aumente la concentración de adiponectina o estimule su acción podría tener una

potencial aplicación terapéutica en el tratamiento de estas enfermedades, pues esta adipocitoquina, además de aumentar la sensibilidad a insulina, presenta propiedades antiinflamatorias [25].

Solo es producida por el tejido adiposo y sus niveles son muy bajos en el plasma de los obesos, asociado a una elevada resistencia a la insulina. Tiene receptores en diversos órganos para regular positivamente la oxidación de ácidos grasos y la acción insulínica.

La disregulación del ratio leptina/adiponectina se ha asociado a enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico e hígado graso no alcohólico [26]

Niveles séricos bajos de adiponectina se han asociado a enfermedades coronarias, hipertrofia cardíaca del ventrículo izquierdo e hipertensión, con riesgo de infarto de miocardio [27, 28, 29, 30].

1.6 Influencia en la salud y consecuencias clínicas de la obesidad

La obesidad conlleva alteraciones metabólicas con un estado inflamatorio y patologías asociadas con alta trascendencia por comorbilidades como la diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, dislipidemia, patologías inflamatorias como la enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico y hasta riesgo de muerte prematura per se en la obesidad mórbida. Entre todas ellas, destacamos la enfermedad cardiovascular, estado patológico caracterizado por la disfunción del corazón y vasos sanguíneos [31, 32].

La obesidad también se ha relacionado con un aumento del deterioro cognitivo asociado al envejecimiento [33].

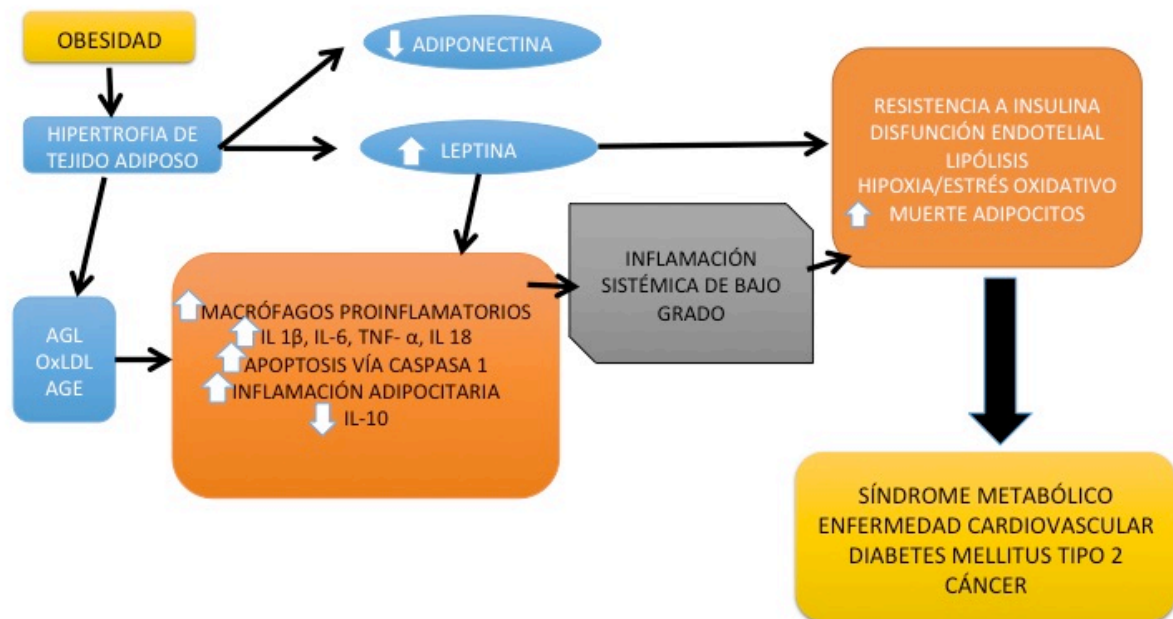


Figura 2. Obesidad y su relación con la inflamación y patologías asociadas. La obesidad lleva consigo una hipertrofia del tejido adiposo, con aumento en los niveles de ácidos grasos libres, esteroides, LDL oxidados y leptina. Se produce una inflamación sistémica de bajo grado con mayores niveles de apoptosis y enfermedades relacionadas como la cardiovascular.

1.6.1. Obesidad: Estrés oxidativo y envejecimiento

Todos los organismos aerobios requieren oxígeno para la producción eficiente de energía, sin embargo, el oxígeno es tóxico en determinadas condiciones celulares, estando mediada esta toxicidad por radicales libres que se forman a partir del mismo como especies parcialmente reducidas altamente reactivas. Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos, por esta configuración electrónica son inestables y extremadamente reactivos, extrayendo electrones de las moléculas cercanas. Existen fuentes exógenas y fuentes intracelulares de radicales libres de oxígeno. Los daños oxidativos producidos por los radicales libres de oxígeno se relacionan con la aparición de distintos tipos de enfermedades y alteraciones clínicas.

Los radicales libres forman parte de muchas reacciones metabólicas y se producen en el organismo en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno, resultando útiles en numerosos procesos. El problema viene cuando estas especies reactivas se producen en exceso ante una **carga nutricional excesiva** o cuando los sistemas de defensa antioxidante fallan, se produce un estrés oxidativo, reaccionando los radicales libres con

los diferentes componentes celulares, originando daño oxidativo celular con la consiguiente progresión de patologías inflamatorias.

Las interacciones de los radicales libres de oxígeno con los constituyentes celulares pueden dar lugar a alteraciones en el metabolismo celular y provocar daños subcelulares que pueden provocar enfermedades o incluso la muerte. Los radicales libres de oxígeno están implicados en muchas patologías y procesos de envejecimiento mediante la activación de la inflamación.



Figura 3. Estrés oxidativo, patologías inflamatorias y envejecimiento

El organismo tiene sistemas de defensa antioxidante primarios y secundarios. Dentro de los primarios, enzimas como la superoxidodismutasa o la catalasa disminuyen concentraciones intra y extracelulares de las especies reactivas de oxígeno (O_2^-). SOD cataliza O_2^- en H_2O_2 . La catalasa cataliza la reducción del H_2O_2 a H_2O y O_2 [34, 35]. Un exceso de SOD que no vaya acompañado de la catalasa puede ser perjudicial para el organismo ya que se acumula peróxido de hidrógeno.

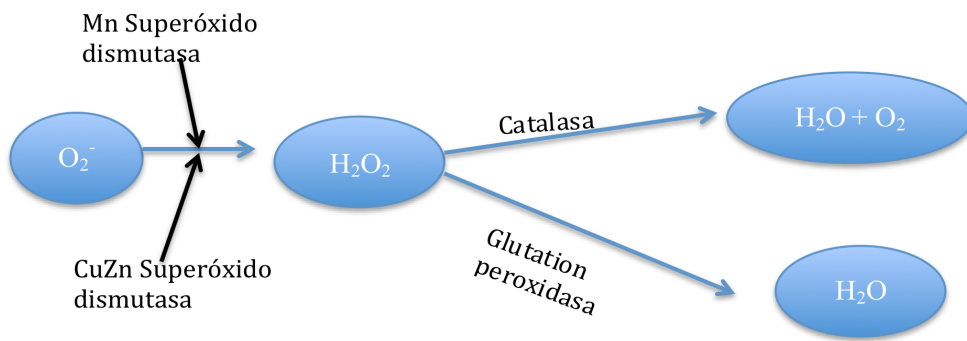


Figura 4. Reducción del anión radical superóxido a través de los sistemas enzimáticos endógenos antioxidantes.

1.6.2 Obesidad y Diabetes Mellitus tipo 2

La resistencia a la insulina es una situación en la que cantidades normales de insulina son inadecuadas para producir una respuesta normal en las células grasas, musculares e hígado. Ello hace que no haya tolerancia adecuada a la glucosa y se produzca una hiperglucemia eventual con efecto perjudicial sistémico, actuando sobre todo el sistema vascular.

Las dietas hipercalóricas prolongadas en el tiempo causan aumento en los niveles de glucosa e insulina favoreciendo el desarrollo de la resistencia a la insulina y diabetes. Así mismo, la inflamación sistémica de bajo grado que caracteriza el proceso de envejecimiento, también contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina por diversas vías.

Estudios que han evaluado ratones alimentados con dietas hipercalóricas, han encontrado alteraciones en los niveles plasmáticos de marcadores que predicen el inicio de la diabetes y una vida más corta, incluyendo niveles aumentados de insulina, glucosa e IGF-1. La persistencia de niveles elevados de glucosa durante más de 60 minutos tras un test de tolerancia a la glucosa es inusual en ratones jóvenes, pero común en animales más viejos [36].

1.6.3 Obesidad y Síndrome Metabólico

El síndrome metabólico, como se describió originalmente (Reaven, 1988) es una combinación de obesidad, hipertensión, tolerancia a la glucosa dañada o diabetes, hiperinsulinemia y dislipidemia (elevación de triglicéridos y disminución de HDL). Todas esas características son también consideradas factores de riesgo para la

aterosclerosis, deduciéndose que el síndrome metabólico constituye un riesgo para los problemas cardíacos.

El estrés oxidativo puede actuar como factor potenciador que explique la relación entre cada componente del síndrome metabólico y otras patologías asociadas. Estas condiciones muestran elevados niveles en suero de productos derivados del daño oxidativo, con un estado proinflamatorio que influye a cada uno de los elementos de forma bidireccional. Se estima que un cuarto de la población adulta mundial está afectada por síndrome metabólico. Es aceptado que el origen de estos desórdenes metabólicos es este estado sistémico “proinflamatorio” derivado de una ingesta calórica excesiva y sobrenutrición, con apoyo de otras condiciones inflamatorias crónicas. Esta hipótesis establece que este estado proinflamatorio, caracterizado por un incremento en los mediadores inflamatorios, como el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), induce resistencia a la insulina, promoviendo mayor inflamación e incrementando la concentración de ácidos grasos libres (derivados sobre todo de la lipólisis) y una interferencia resultante de los efectos antiinflamatorios de la insulina. Este estado proinflamatorio se traduce en un incremento del estrés oxidativo, con la capacidad de dañar mecanismos biológicos fundamentales [37, 38, 39, 40].

1.6.4 Obesidad y patología cardiovascular

Los cambios metabólicos e inflamatorios que se dan durante la obesidad, incrementan los problemas cardiovasculares asociados al estado proinflamatorio que caracteriza el envejecimiento. La incidencia de patologías cardiovasculares y metabólicas está creciendo en la población mundial en los últimos tiempos, obteniéndose una mayor prevalencia en individuos obesos. Numerosos estudios demuestran que un exceso de tejido adiposo, principalmente en el abdomen, se asocia con complicaciones cardiovasculares como hipertensión y problemas arteriales [18,19,20,31,32].

1.7 Tratamiento de la obesidad

El tratamiento de la obesidad sigue siendo un desafío, hay diferencias entre pacientes siguiendo las mismas pautas terapéuticas, siendo pocas enfermedades tan resistentes al tratamiento de la misma. El arsenal terapéutico para hacer frente a la obesidad se basa en la dieta y ejercicio, junto a tratamiento conductual y uso ocasional

de fármacos. La cirugía, queda para grandes obesidades resistentes a medidas convencionales, teniendo bastante eficacia.

En lo que se refiere al tratamiento farmacológico, a partir de los 6 meses de uso, se produce tolerancia farmacológica y su efectividad desaparece en la mayoría de los casos [41]. Pueden actuar a través de tres vías: controlando el apetito, disminuyendo la absorción de nutrientes o aumentando el gasto metabólico. Actualmente existen dos opciones farmacológicas: Sibutramina y Orlistat, quedando su prescripción limitada a grupos concretos.

2. ENVEJECIMIENTO

2.1. Conceptos y bases del envejecimiento

El envejecimiento, como proceso natural intrínseco común a todos los seres vivos, tiene una gran importancia social. Actualmente, más del 20 % de la población mundial supera los 65 años y la esperanza de vida es cada vez mayor. Hay que diferenciar entre vivir más y vivir mejor, es por ello que el estudio del envejecimiento y sus patologías asociadas está en auge y centra numerosos estudios de investigación para tratar de conseguir alcanzar la edad máxima en las mejores condiciones físicas, mentales y emocionales. Cada vez la incidencia de enfermedades crónicas relacionadas con la edad y el envejecimiento es mayor, suponiendo un coste importante para el sistema de atención sanitaria, lo que hace el estudio del envejecimiento y sus patologías asociadas más importante si cabe. Algunas de las principales enfermedades asociadas a este proceso son enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares o cáncer [42].

Se conoce como envejecimiento al fenómeno, común a todos los organismos multicelulares, descrito como un declive endógeno y progresivo en la eficacia de los procesos fisiológicos tras la fase reproductora de la vida, provocando función alterada y resultando en vulnerabilidad aumentada [43]. Este deterioro es el principal factor de riesgo para numerosas patologías humanas.

El envejecimiento, como proceso independiente a las enfermedades asociadas, representa los cambios fisiológicos universales e inexorables que se producen por la edad sin estar afectados por enfermedades asociadas al mismo o por el entorno. Pero

este envejecimiento está muy influenciado por el entorno, estilo de vida, hábitos nutricionales y enfermedades derivadas del paso de los años.

Cada especie tiene una edad característica a la cual todos los individuos de la misma ya habrán muerto, en el humano esta edad de vida máxima está en torno 110-120 años. Desde 1840 las expectativas de vida media han ido creciendo junto con la inversión en salud, apareciendo enfermedades hasta ahora infrecuentes como las diversas enfermedades de tipo cardiovascular. La población anciana cada vez adquiere un mayor peso poblacional, adquiriendo el estudio del envejecimiento una importancia mayor conforme avanza este cambio. A partir de los 50 años de edad se multiplica de forma exponencial la presencia de patologías asociadas a la edad y se ha estimado que para el año 2050, un tercio de la población alcance más de 80 años (400 millones de personas). España será el país más envejecido del mundo, debido a las migraciones, descenso de natalidad y aumento de la esperanza de vida.

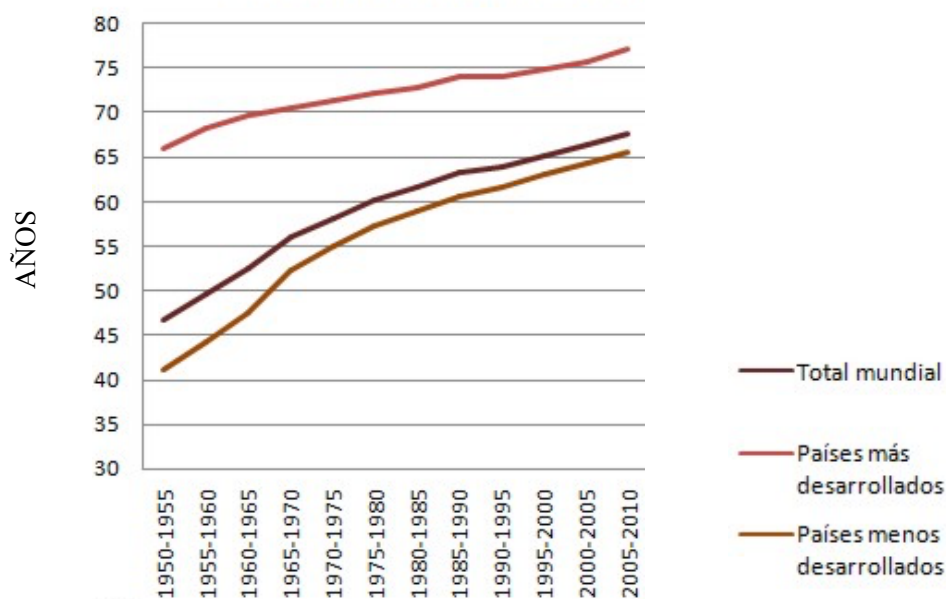


Figura 5. Esperanza de vida al nacer en las últimas décadas

En la vida humana hay un primer proceso evolutivo que culmina en la madurez, seguido de un proceso de involución correspondiente al envejecimiento. La suma de todas las alteraciones producidas en el organismo con el paso del tiempo conduce a la pérdida funcional y la muerte. Su inicio se da en un momento indeterminado de la madurez, con fases de evolución diferentes para cada individuo, la edad fisiológica y cronológica no siempre coinciden.

El estudio del envejecimiento ha evolucionado mucho en los últimos años, vías genéticas y procesos bioquímicos conservados durante la evolución se han descubierto como reguladores del proceso de envejecimiento, lo que abre vías de estudio e investigación para su mejor conocimiento y posible control terapéutico.

El proceso de envejecimiento se relaciona con la acumulación de mutaciones e inestabilidad genómica, alteraciones epigenéticas y desgaste en telómeros con pérdida del mantenimiento en la integridad de las proteínas, lo que resulta en una afectación celular y pérdida funcional y estructural del organismo con el paso de los años. Daños exógenos como radiación ultravioleta o químicos, así como daños endógenos como radicales libres, errores de replicación o reacciones espontáneas pueden dar lugar a lesiones en el ADN. La acumulación de daño en el ADN celular ocurre sobre todo durante la etapa de replicación en las divisiones celulares generando alteración en la función celular. Normalmente las células disponen de mecanismos para corregir los fallos replicativos del ADN pero estos mecanismos no son perfectos y la acumulación de errores no reparados es irreversible y va conformando el proceso de envejecimiento celular con daño genético e inestabilidad genómica [44, 45]. A causa de este daño y envejecimiento celular caracterizado por aumento de especies reactivas de oxígeno, daño al ADN, acumulación de orgánulos disfuncionales y proteínas alteradas se produce la senescencia celular o replicativa como mecanismo para evitar la proliferación en respuesta al daño que ocurre durante la replicación. Esta senescencia celular o replicativa fue propuesta en 1961 y estudiada en años posteriores [46, 47, 48].

En edades tempranas, la senescencia celular actúa ante un daño esporádico, bloqueando la proliferación de células dañadas conservando la homeostasis tisular con efectos antienvjecimiento [49] pero, conforme envejecemos, esta senescencia pasa a conformar un **fenotipo secretor** irreversible y dañino. Lleva consigo la secreción de interleuquinas, factores de crecimiento, enzimas degradativas y proteínas insolubles [50]. Esto altera la homeostasis celular y de los tejidos, pudiendo afectar a células vecinas y promoviendo progresión tumoral [51, 52]. Este fenotipo secretor se estimula ante el daño genómico para tratar de reparar los tejidos, atrayendo células inmunes para producir inflamación local y tratar de eliminar estas células senescentes de los tejidos [53]. El problema viene dado cuando este proceso no es algo puntual, sino que se cronifica por disminución de la eficacia del proceso durante el envejecimiento, viéndose involucrado en numerosas patologías asociadas a la inflamación y la edad como la

obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, aterosclerosis y patología cardíaca [54, 55]. Además de la senescencia celular, se asocia al proceso de envejecimiento una disfunción mitocondrial y disregulación de las vías de asimilación de nutrientes [49].



Figura 6. Marcadores de envejecimiento. Modificada de López-Otin C, Blasco MA. The hallmarks of aging. *Cell*. **2013**, 153: 1194-1217.

Vida media y vida máxima

La vida máxima es aquella a la que el individuo más longevo de una especie determinada ha llegado. En el humano se establece en 110-120 años.

La vida media o expectativa de vida es la edad a la cual el 50 % de los individuos de una especie determinada sobreviven. En los humanos ha aumentado en los últimos miles de años de forma drástica. Hace 50000 años la vida media en humanos era 20 años por los accidentes y enfermedades, raramente se llegaba a los 40. El avance de la medicina y la nutrición ha hecho que pasemos a tener una vida media de unos 75 años en los países industrializados, siendo gran parte de este crecimiento en los últimos 150 años. Este incremento de la vida media no ha elevado la vida máxima que ha seguido establecida en unos 120 años. El objetivo de la ciencia es conseguir alcanzar este límite vital en las mejores condiciones físicas, mentales y emocionales, para, en un futuro, tratar de superarlo [56].

Edad biológica y edad real

La mayor parte de la investigación del envejecimiento en humanos hasta el momento se ha realizado en adultos de edad avanzada, muchos con enfermedades crónicas, por ello, poco se conoce del envejecimiento en adultos jóvenes. Al estudiar y valorar el envejecimiento en adultos jóvenes sin patologías previas asociadas a la edad, se demuestran diferencias en su edad biológica valorando diferentes órganos. Los que envejecen más rápido, tienen menos capacidades físicas, deterioro cognitivo y mayor envejecimiento cerebral, peor estado de salud general y apariencia más envejecida. Mediante métodos de evaluación de la edad biológica podremos identificar causas de envejecimiento y valorar terapias de rejuvenecimiento a edades tempranas.

Una identificación y cuantificación precoz del envejecimiento acelerado en personas jóvenes, previo a la aparición de enfermedades crónicas, puede ofrecernos oportunidades de prevención pero, sobre todo, la posibilidad de medir el envejecimiento en adultos jóvenes nos permitirá valorar la efectividad de tratamientos antiedad sin tener que esperar a valorar su ciclo de vida, abriendo una vía a los estudios y terapias anti envejecimiento [57].

2.2 Teorías de envejecimiento

Existen numerosas teorías que tratan de explicar el por qué envejecemos [58]. A destacar la que explica el envejecimiento por acumulación de radicales libres, estrés oxidativo mitocondrial y lesión mitocondrial, de ahí la importancia de analizar la mitocondria y las alteraciones que sufre cuando estudiamos el envejecimiento.

Las teorías existentes se pueden simplificar en aquellas que consideran al envejecimiento un evento programado, y aquellas que lo consideran como una acumulación de fallos y errores en nuestro organismo. Se clasifican en 2 grandes bloques que tratan de explicar los fenómenos y procesos que se dan en el envejecimiento: Teorías genético-evolutivas y teorías estocásticas.

Teorías genético-evolutivas

Consideran que el envejecimiento es parte de un desarrollo y maduración continuo, controlado y programado genéticamente. Nuestro ADN fijaría un límite máximo a alcanzar en condiciones ideales. Ante esto chocaría el control tan estricto que existe respecto a los fenómenos de desarrollo del envejecimiento mediante vías

genéticas y bioquímicas, así como la diversidad de expresión que alcanzan los efectos del mismo. Proponen que el envejecimiento es la continuación del proceso de desarrollo y diferenciación, siendo una secuencia de eventos codificados en el genoma. Esta teoría explica que entre los principales genes que determinan la expectativa de vida de una especie se encuentren aquellos que regulan la reparación y mantenimiento de células somáticas. La mayoría de estos genes están también involucrados en las rutas de respuesta celular al daño oxidativo y podrían explicarse por teorías estocásticas.

Algunos científicos piensan que las claves del envejecimiento han de buscarse en el proceso de división celular, llevándonos a la teoría de los telómeros. Los telómeros se encuentran en los extremos de los cromosomas, acortándose con cada división celular hasta un límite donde la célula no se puede dividir más y muere. Según la hipótesis de Olovnikov, el acortamiento de los telómeros en cada ciclo de división celular limita la proliferación de los cultivos celulares, correspondiéndose con el límite de Hayflick [59].

Teorías estocásticas

Defienden que el envejecimiento es causado por daños al azar en diferentes moléculas biológicas con ineficiencia de los mecanismos celulares reparativos para solucionar los problemas causados por estrés, radiación UV o infecciones, acumulándose con la edad hasta llegar al declive fisiológico que conocemos como envejecimiento [60]. En 1928 Pearl habla de tasa metabólica, siendo inversamente proporcional a la expectativa de vida de una especie [61]. En 1956 Harman propone la explicación bioquímica de esta interrelación postulando la **teoría de los radicales libres**, siendo en la actualidad una de las teorías más aceptadas [62]. Propone que el envejecimiento normal es el resultado del daño aleatorio a los tejidos mediado por los radicales libres, enfocando la teoría hacia la **mitocondria** como principal fuente de producción de radicales libres y blanco del daño de los mismos. Posteriormente, Jaime Miquel propuso la teoría mitocondrial basada en el daño progresivo del ADN mitocondrial por especies reactivas del oxígeno, muchas de estas especies no son radicales libres por lo que actualmente se habla de la **teoría del estrés oxidativo** [63]. Existen otras teorías estocásticas pero con similitudes a la del estrés oxidativo o que podrían ser explicadas por esta. Ej: Teorías de la glicosilación (formación de proteínas glicosiladas da lugar a alteración de funciones celulares), teoría de los determinantes de longevidad (el envejecimiento es causado por los productos del metabolismo, siendo el

grado de envejecimiento determinado por la capacidad de cada uno para protegerse frente a esos productos) [64].

Estrés oxidativo, mitocondria y envejecimiento

La **teoría mitocondrial del envejecimiento**, vinculada a la teoría del estrés oxidativo, es en la actualidad una de las más aceptadas. La mitocondria es la principal productora de radicales libres a nivel celular, siendo el orgánulo más dañado de forma directa por los mismos, condicionando el grado de envejecimiento celular.

Esta teoría del estrés oxidativo mitocondrial y lesión mitocondrial, sugiere que el envejecimiento se liga a la destrucción progresiva e irreversible de mitocondrias por los radicales libres de oxígeno, que solo se producen en las células fijas postmitóticas. A causa del entorno mutagénico y la falta de protección del genoma mitocondrial (no tiene histonas ni mecanismos de reparación por escisión y recombinación), las mitocondrias pierden con el tiempo su información genética, desorganizándose, perdiendo capacidad de síntesis de ATP y función fisiológica. Hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad del sistema biológico para reparar el daño resultante.

Mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos celulares citoplasmáticos de las células eucariotas, con forma ovoide, encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, sintetizando ATP gracias a los carburantes metabólicos (glucosa, ácidos grasos y aminoácidos), consumiendo oxígeno y produciendo dióxido de carbono y agua como productos de la respiración celular. Tiene doble membrana, una membrana externa porosa y otra interna muy rica en proteínas, siendo la barrera de permeabilidad para los iones. Como todas las membranas biológicas se componen de lípidos y proteínas, pero la interna es muy diferente al resto ya que tiene más del 80 % compuesto por proteínas (las demás membranas entorno al 50%). Los complejos proteicos que forman la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTEmt) son los encargados de producir la energía para la vida (ATP). La oxidación de los alimentos y pérdida de electrones de los mismos es seguida por la recepción de estos electrones por los transportadores electrónicos en la CTEmt que se compone de cuatro complejos enzimáticos lipoproteicos.

La mitocondria es fuente de estrés oxidativo porque produce anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como producto de la reducción univalente y bivalente del oxígeno. Esta producción es habitual durante el metabolismo aeróbico, sobre todo a nivel mitocondrial. Entre el 1 y el 5 % del oxígeno que consume la mitocondria no queda reducido en agua, transformándose en O_2^- , el cual pasa a H_2O_2 de forma espontánea o tras la acción de superóxido dismutasa. Así mismo, la mitocondria es blanco del estrés oxidativo producido, las membranas biológicas son muy sensibles y la oxidación de los lípidos de la membrana mitocondrial altera su función, tanto la fluidez de la misma como la relación con las proteínas adyacentes. El daño oxidativo de las proteínas mitocondriales, por el estrés oxidativo directamente, o por la peroxidación lipídica, hace que pierdan su función provocando la apertura del poro de transición, lo cual es clave en procesos de apoptosis.

La mitocondria tiene un genoma propio, diferente en estructura y organización al nuclear. Este ADN mitocondrial no está protegido por histonas y es más susceptible a ser atacado por procesos oxidativos, aunque también tenga ciertos sistemas de reparación. El daño oxidativo al ADN mitocondrial es más perjudicial de cara al envejecimiento que el provocado sobre lípidos y proteínas, ya que los daños fisiológicos producidos en el ADN mitocondrial se pueden propagar por la capacidad de división mitocondrial y celular. Además el daño a este ADN mitocondrial es incluso más importante que el daño al ADN nuclear, ya que todo el genoma mitocondrial codifica genes que son expresados, mientras el nuclear tiene muchas secuencias que no se transcriben. Las afectaciones más comunes por estrés oxidativo en el ADN mitocondrial son la alteración oxidativa de bases, aumento del número de deleciones y aparición de mutaciones puntuales, siendo la base de importantes patologías humanas. Las consecuencias fenotípicas de una mutación del ADN mitocondrial serán defectos relacionados con la fosforilación oxidativa de la mitocondria, siendo estos también, la base de las alteraciones que se asocian a un proceso normal de envejecimiento [65,66]

Mitocondria y su implicación en el envejecimiento

El estrés oxidativo mitocondrial es determinante durante el proceso de envejecimiento y marca la fisiología de los organismos, siendo su pérdida de funcionalidad común a todo proceso de envejecimiento. La mitocondria es uno de los principales blancos durante el proceso, siendo el nexo de unión entre la acumulación del daño oxidativo y las alteraciones fisiológicas. Numerosos estudios han demostrado esta

relación, analizando las variaciones que sufren, con la edad, las mitocondrias y cómo intervenciones experimentales provocan variaciones en la vida media de las especies [67]. La mitocondria regula también los procesos de apoptosis, perdiéndose esta regulación en células viejas, siendo a su vez, estas, más susceptibles al estrés oxidativo y conllevando mayor apoptosis.

El envejecimiento es un proceso endógeno y progresivo, que provoca a lo largo de la vida alteraciones en los componentes mitocondriales, como es el ADN mitocondrial, con un importante componente oxidativo deteriorando estructura y función mitocondrial. El daño irá en función de la capacidad del tejido concreto para reparar o eliminar las células alteradas, teniendo mayor o menor repercusión en la afectación de la función tisular. Tejidos con capacidad regenerativa como el hígado, pueden corregir el daño y no presentan pérdida de función mitocondrial, analizado mediante la actividad citocromo c oxidasa. Pero al producirse daños en tejidos postmitóticos como el corazón, sin capacidad de reemplazo celular y sistema de reparación menos efectivo de los daños mitocondriales, provocará pérdida de función, comprobada con menor actividad citocromo c oxidasa, asociado a mutaciones de ADN mitocondrial [68]. Consecuentemente, se producen desacoplamientos de la CTEmt, ineficacia bioenergética y mayor producción de ROS. Las mitocondrias de estos tejidos postmitóticos intentan compensar esta situación aumentando otros componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial como el citocromo b o aumentando la poliinsaturación de la membrana para aumentar la fluidez y la actividad de la citocromo c oxidasa restante. Sin embargo, ambos mecanismos de compensación provocan más radicales libres.

Se ha demostrado un aumento en el número de mitocondrias en tejido hepático con la práctica de ejercicio y la ingesta calórica reducida, siendo la actividad de citrato sintasa un indicador del contenido mitocondrial [69].

2.3 Características del envejecimiento

Las alteraciones genómicas y proteicas que se producen durante el proceso, conllevan disfunción mitocondrial, disregulación de vías metabólicas, como la resistencia a la insulina, y alteraciones de la homeostasis celular con senescencia celular consecuente. Aparecen niveles aumentados de especies reactivas del oxígeno, daño de ADN, acumulación de orgánulos disfuncionales, proteínas alteradas y oxidación de

lípidos. El control de la calidad celular se pierde progresivamente durante el envejecimiento. La autofagia, es una vía fundamental para el control de calidad celular, siendo un mecanismo de reparación del daño celular para mantener la homeostasis. Esta se altera y vuelve menos eficiente con menos capacidad reparativa. Los cambios, graduales y progresivos, no ocurren a la misma velocidad ni en igual grado de afectación, por ello cada individuo tiene su velocidad de envejecimiento.

Se observan cambios en todas las células, tejidos y órganos corporales, afectando al funcionamiento de todos los sistemas del organismo. Las células cambian de tamaño, se alteran sus membranas y componentes citoplasmáticos, pierden función de división y reproducción, observándose mayor presencia de pigmentos y depósitos.

Los tejidos acumulan productos de desecho y se altera la función de órganos, sistemas y el organismo en general. Se observan cambios físicos, destacando cambios en la composición corporal, disminuyendo densidad ósea y masa corporal magra, aumentando la grasa corporal y disminuyendo la estatura. Se aprecia un **fenotipo inflamatorio de bajo grado** asociado, acompañado de un aumento de estrés oxidativo, que participa en el desarrollo de patologías inflamatorias comunes al proceso como son la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, así como la artritis [Figura 7].

Dentro del sistema cardiovascular, el corazón incrementa levemente su tamaño, con una pared cardíaca más gruesa, incrementan los depósitos de lipofucsina y se produce un engrosamiento y rigidez de las válvulas cardíacas. El músculo cardíaco pierde elasticidad, bombeando menos y teniendo que hacer más trabajo para compensar esa pérdida de eficacia. Aparecen alteraciones en la frecuencia cardíaca por pérdida de células marcapasos, desarrollo de tejido fibroso y depósitos de grasa.

Los vasos sanguíneos también sufren cambios, teniendo menos elasticidad. La aorta se vuelve más rígida y gruesa, aumentando ligeramente la tensión arterial por aumento de la resistencia periférica.

Aun así, el corazón es suficientemente fuerte para un abastecimiento normal pero ante lesiones o demandas extra de trabajo, causados por el estrés o diversas enfermedades, tendrá una respuesta disminuida. Pudiendo desencadenar hipertensión, arritmias, infartos y demás patologías cardiovasculares [49].



Figura 7. Cambios durante el envejecimiento y patologías asociadas

2.4 Genética y vías del envejecimiento

El envejecimiento y la longevidad están afectados por los genes. Se ha estimado en un 25 % el peso relativo de los genes en la duración de la vida en humanos.

En las primeras explicaciones evolutivas y teorías del envejecimiento se defendía la existencia de una programación genética para limitar el tamaño poblacional y la superpoblación, sugiriendo la existencia de un gen del envejecimiento [59]. Actualmente se sabe que los genes pueden alterar el grado de envejecimiento, pero ninguno lo evita en su totalidad, ya que no hay genes expresamente diseñados para el envejecimiento, aunque si hay genes que alteran la longevidad. No estamos programados para morir mediante un gen del envejecimiento sino para sobrevivir, no siendo esta programación tan perfecta como para vivir de forma indefinida.

Pese a no existir un gen específico para el envejecimiento se ha demostrado que numerosas mutaciones pueden modificar el grado de envejecimiento. Diferentes estudios con modelos experimentales están consiguiendo confeccionar un mapa de genes y rutas que regulan aspectos del mismo.

En el control y modulación de las rutas de envejecimiento destacan: AMPK, IGF-1, Sirtuinas y mTOR [Figura 8].

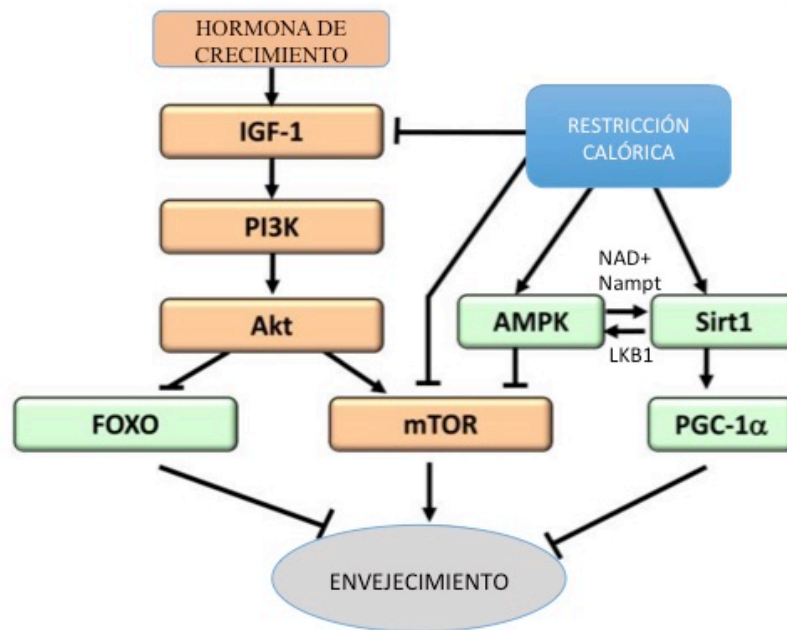


Figura 8. Vías de señalización en el envejecimiento y su interrelación. En verde, moléculas que tienen propiedades anti-envejecimiento, en naranja aquellas que favorecen el envejecimiento. Modificada de López-Otin C, Blasco MA. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013, 153: 1194-1217.

Proteína quinasa activada por AMP

AMPK es una proteína quinasa compuesta por dos subunidades α , dos β y tres γ , reguladas por la unión de AMP. Es un regulador metabólico de la relación entre AMP/ATP, estando involucrado en el **metabolismo de la glucosa y los lípidos** gracias a que promueve la sensibilidad a la insulina y la oxidación de los ácidos grasos [70, 71]. Modula la **autofagia**, induciendo autofagia en condiciones de depleción de energía celular con bajos niveles de ATP o bajos niveles de glucosa. También modula la **función mitocondrial** al provocar destrucción de mitocondrias defectuosas mediante la mitofagia, autofagia específica a nivel mitocondrial, y la biogénesis mitocondrial [72]. AMPK modula, a su vez, otras vías importantes del envejecimiento como IGF-1 [73] y es responsable del aumento de NAD⁺ y la nicotinamida fosforribosiltransferasa (Nampt) que actúan sobre SIRT1 [74]. Además inhibe mTOR.

AMPK es esencial para mantener la homeostasis cardiometabólica, demostrando ser

cardioprotectora durante la isquemia [75].

Debido a esta regulación fundamental en el equilibrio energético y el metabolismo que realiza AMPK, su modulación es interesante para regular las vías metabólicas, habiéndose demostrado su implicación en el aumento de longevidad ante tratamientos con restricción calórica [76].

Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1)

IGF-1 es una proteína, similar en estructura molecular a la insulina, encargada de estimular el crecimiento y la proliferación celular, siendo un potente inhibidor de la autofagia. Un aumento de IGF-1 se relaciona por tanto con disminución de la resistencia al estrés y disfunción metabólica por inhibición autofágica. Fue uno de los primeros genes relacionados con el envejecimiento, una reducción de la señalización de IGF-1 se demostró como previene el envejecimiento celular y el inicio de patologías [77]. Se ha demostrado, cómo mutaciones y variaciones en la señalización de IGF-1 conllevan una vida más longeva en humanos [78, 79, 80]. También se ha observado durante la restricción calórica una reducción de la señalización de IGF-1 que contribuye a los efectos anti-envejecimiento [81].

IGF-1 interviene también en otras vías importantes del envejecimiento modulando mTOR a través de AKT (proteína quinasa B) [82].

Sirtuinas

Su nombre proviene de **S**ilent mating type **I**nformation **R**egulation **T**wo y el sufijo convencional para las proteínas (**-ina**). Conforman una familia de proteínas, desacetilasas de histona NAD-dependientes y ADP ribosiltransferasas que consiguen silenciado de la cromatina. En los mamíferos hay siete miembros de la familia sirtuina con diferentes localizaciones en la célula. Modulan la expresión de ciertos genes regulando varias funciones celulares como la reparación del ADN y el ciclo celular, mejorando la resistencia al estrés, función mitocondrial y autofagia [83].

Su modulación durante el envejecimiento ha sido ampliamente estudiada [84, 85] demostrando que regulan procesos como el metabolismo de grasas, producción de glucosa e insulina y favorecen la supervivencia celular. Un aumento de sirtuina se relaciona con aumento de la autofagia [86] y parecen mediar en los efectos beneficiosos

de la restricción calórica en mamíferos [87]. Así mismo se relaciona con otras vías importantes del envejecimiento como AMPK, regulándola a través de la desacetilación de LKB1 (proteína quinasa hepática B1) [88]. También modula IGF-1 a través de la expresión de UCP2 [89] y media en la inhibición de la actividad mTOR [90].

A nivel cardiovascular se han realizado estudios que demuestran cómo las sirtuinas tienen efectos beneficiosos para la prevención de patologías cardiovasculares y fallos cardiacos, aunque los mecanismos moleculares por los que realizan esta regulación aún siguen siendo objeto de estudio [91, 92, 93].

El estado de acetilación de PGC-1 α es un marcador de la actividad de Sirt1 *in vivo*.

Diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR)

Proteína quinasa reguladora del crecimiento celular, interviene en la síntesis proteica y metabolismo celular en respuesta a nutrientes, factores de crecimiento, ATP y estrés. Su inhibición se relaciona con un aumento de autofagia y mayor resistencia al estrés. Interviene en otras vías de señalización como la PI3K/AKT/mTOR siendo un regulador del metabolismo cardiovascular y envejecimiento. La ruta mTOR es fundamental para la manifestación del envejecimiento cardiaco, con función reguladora clave en la fisiología y patología cardiovascular. La inhibición total de mTOR es incompatible con la vida [94] pero su inhibición parcial y selectiva se plantea como beneficiosa con efecto cardioprotector, prolongando la vida útil en modelos animales por reactivación de autofagia cardiaca y mejor función mitocondrial.

Su eliminación o inhibición a través de la rapamicina ha demostrado un aumento de autofagia y aumento de la vida útil en diferentes organismos [95, 96, 97]. También se ha demostrado mejoría en la hipertrofia cardiaca ante su inhibición [98]. Además de con la rapamicina, se ha demostrado su inhibición ante la restricción calórica, activando la autofagia y mejorando la salud durante el envejecimiento.

Mediante el estudio de estas vías, se ha demostrado la importancia del control metabólico mediado por proteínas codificadas a partir de genes fundamentales en el proceso de envejecimiento, teniendo la mitocondria un papel primario.

2.5 Telómeros

Los telómeros son estructuras compuestas por secuencias de nucleótidos repetidas situadas al final de los cromosomas, con la función de mantener la integridad de las terminaciones cromosómicas, evitando enmarañamientos o adhesiones de unos a otros, siendo fundamentales para evitar pérdida de secuencias de ADN interiores.

La longitud del telómero es variable, dependiendo del genotipo, tipo de célula e historia celular replicativa. Esta secuencia repetitiva de ADN disminuye su tamaño en cada proceso de división celular, siendo esta disminución en la longitud de los telómeros una de las causas de la entrada en senescencia replicativa de la célula. La telomerasa, es una ADN polimerasa especializada que puede replicar los telómeros, pero solo está presente en las células germinales, no estando presentes en las células somáticas de mamíferos normales.

En numerosos estudios se han demostrado telómeros más cortos en ciertos tejidos de población anciana que en personas jóvenes, así como en enfermedades marcadas por envejecimiento prematuro con telómeros más cortos y un acelerado acortamiento de los mismos. La valoración y variación en la longitud de los telómeros será, por tanto, de utilidad a la hora de estudiar el envejecimiento [99].

2.6 Efecto de la dieta en el envejecimiento

La importancia del estudio de la nutrición en el proceso de envejecimiento, radica en que una alimentación adecuada a lo largo de nuestra existencia nos lleva a una vida más prolongada y a que ésta transcurra con menor incapacidad [100]. Hemos analizado cómo una malnutrición, con una dieta continuada alta en grasas, provoca obesidad secundaria con hipertrofia del tejido adiposo y mayor cantidad de ácidos grasos libres, LDL oxidados y ácidos grasos esteroideos, además de la disregulación en el funcionamiento de la leptina y adiponectina. Se produce una hipercolesterolemia y aumento de radicales libres del oxígeno con producción de estrés oxidativo y mayor daño mitocondrial. Esta situación provoca una inflamación sistémica de bajo grado en el organismo, empeorando el fenotipo inflamatorio presente ya de por sí durante el envejecimiento y desencadenando una mayor progresión de patologías vinculadas a procesos degenerativos durante este proceso de envejecimiento.

Se ha considerado el papel de los genes en un 25% de responsabilidad dentro del envejecimiento, por lo que el 75 % restante se relaciona a los hábitos de vida, como es

la nutrición y el ejercicio físico, así como factores ambientales. La nutrición es considerada un elemento fundamental en el proceso de envejecimiento. Son numerosos los estudios basados en la restricción energética y en la suplementación con sustancias antioxidantes, así como el uso de dietas modificadas, para valorar los cambios producidos.

La **restricción calórica** apoya y demuestra la importancia de la nutrición durante el envejecimiento. Se basa en la limitación en la ingesta de alimentos, siendo descrito en 1935 por McCay et al [101]. Aumenta la vida media en un gran número de roedores y otras especies, además de disminuir la velocidad de aparición de enfermedades que se relacionan con la edad. Esto es debido a un menor estrés oxidativo producido al metabolizar alimentos y menos radicales libres derivados, generando menor actividad inflamatoria y menor aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento con menor índice de oxidación de lípidos, proteínas y ADN [102].

La restricción calórica modula las vías involucradas en la longevidad, regulando genes claves implicados en el envejecimiento como son la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), dinucleótido adenina nicotinamida (NAD⁺), sirtuinas y la diana para rapamicina en células de mamífero (mTOR). Esta modulación provocará aumento de autofagia y disminución de la ruta mTOR a través del aumento de AMPK y sirtuinas, mejorando la calidad de vida y longevidad.

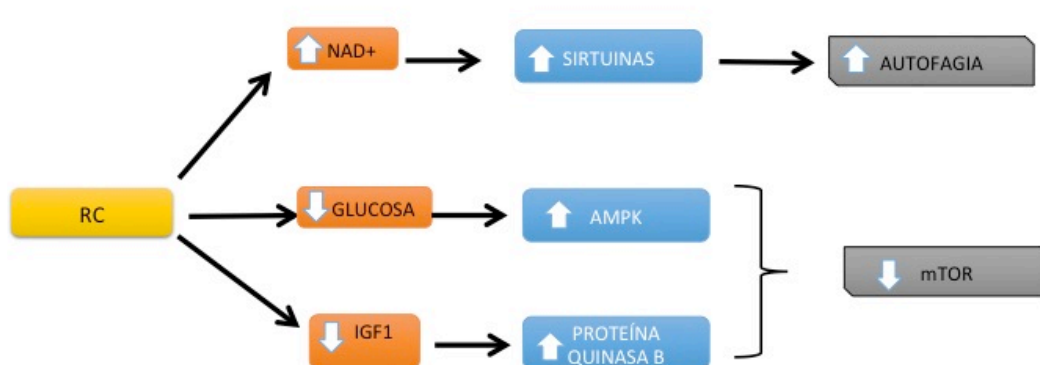


Figura 9. Restricción calórica y vías del envejecimiento

El efecto de la restricción calórica sobre la longevidad, con un aumento en la vida media y mejor estado de salud general ha sido estudiado en numerosos trabajos [103, 104, 105, 106].

2.7 AUTOFAGIA Y ENVEJECIMIENTO

Los tipos de muerte celular que se dan durante el envejecimiento incluyen procesos de apoptosis, autofagia y necrosis. Los procesos de muerte celular programada son debidos a la autofagia y la apoptosis. La necrosis, sin embargo, es consecuencia de una forma de daño celular, provocada por un agente nocivo, que da lugar a muerte prematura no programada de las células por autolisis.

Durante el envejecimiento se observa una **autofagia dañada** con acúmulo de desechos celulares, mitocondrias dañadas y estado proinflamatorio generalizado. Una correcta autofagia es esencial para conseguir un envejecimiento saludable y el análisis de la autofagia nos permitirá determinar y valorar el daño y grado de envejecimiento de cada organismo objeto de estudio [107, 108, 109].

La autofagia es un importante mecanismo de control de la calidad celular, presente en todas las células eucariotas, mediante el cual se produce la degradación y reciclaje de los componentes celulares dañados en los lisosomas, para garantizar la salud del organismo y la supervivencia celular, ya sea de forma basal o en condiciones de estrés. La palabra fue acuñada por C. Duve en 1963, comida (fagia) propia (auto). Su papel es múltiple, hay un nivel basal de autofagia que realiza un mecanismo de control de calidad en la célula, eliminando aquello que se considere defectuoso (mecanismo de ajuste del metabolismo celular al estatus nutricional de la célula). Esta autofagia basal, participa en procesos naturales como el metabolismo energético, reciclado de orgánulos, regulación del crecimiento, inicio del desarrollo embrionario, envejecimiento, etc...[110]. Además de la autofagia basal, ésta se puede activar cuando hay algún tipo de estrés celular, infección por patógenos o malformaciones celulares internas. Estas vías se desarrollan a través de los genes relacionados con la autofagia, destacando los genes ATG.

Normalmente, cuando hablamos de autofagia es para referirnos a la *macroautofagia*: Se engloban elementos citoplasmáticos en un compartimento de doble membrana (autofagosoma) que se fusiona al lisosoma para degradar su contenido. Además de la misma, también existe la *microautofagia*: Invaginaciones del lisosoma, normalmente englobando material citosólico, que se desprenden, quedando en el interior del mismo para degradarse. También distinguimos la *autofagia mediada por chaperonas*: Proceso autofágico mediante el cual se incorporan proteínas citosólicas al lisosoma gracias a un

transportador localizado en la membrana del lisosoma. Por último, también existe la *crinofagia*: Basado en la fusión de vesículas destinadas a la exocitosis, con el lisosoma [Figura 10].

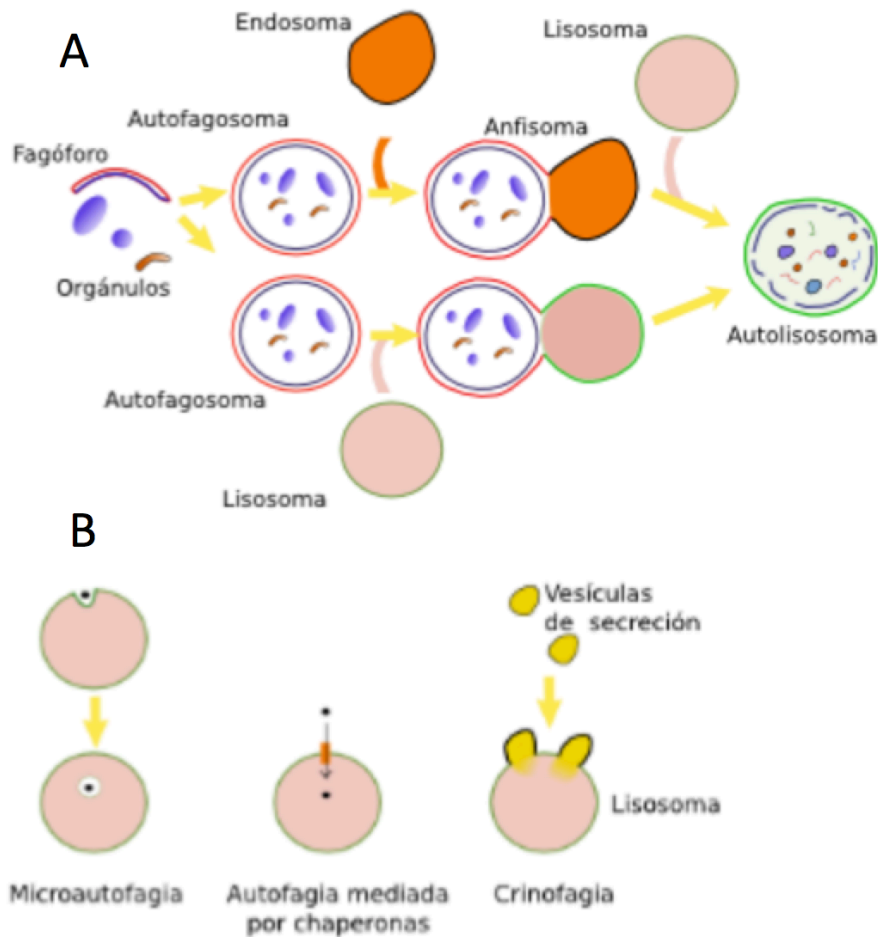


Figura 10. (A) Macroautofagia. Tras la aparición del *fagóforo* o también llamada membrana de aislamiento (comienza con la formación de una cisterna membranosa proveniente del RE), se produce cierre de sus membranas formándose el *autofagosoma* (rodeado por una doble membrana). Las membranas del fagóforo reconocen las moléculas u orgánulos a degradar. Tras ello se puede fusionar a un *endosoma* (formando el *anfisoma*) pero el final es fusionarse con un lisosoma y formar el *autolisosoma* donde se degrada su contenido. Modificado de Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews in molecular and cell biology*. 2007; 8:931-7. **(B) Microautofagia, Autofagia mediada por chaperonas y Crinofagia.** Modificado de Eskelinen G-L. New insights into the mechanisms of macroautophagy in mammalian cells. *International review of cell and molecular biology*. 2008. 266:207-247.

La función de la autofagia en condiciones normales, es favorecer el mantenimiento u homeostasis celular. En ausencia de estrés celular, el nivel basal de autofagia conforma

el principal mecanismo de degradación de contenido celular, junto con los proteosomas, realizando un mecanismo de control de calidad, siendo la única vía que degrada orgánulos completos como mitocondrias, peroxisomas o retículo endoplasmático. En situaciones de estrés, la autofagia actúa como respuesta para favorecer la supervivencia celular ante condiciones adversas.

El proceso de envejecimiento conlleva un progresivo descenso del mantenimiento de los sistemas proteicos y homeostasis celular, debido a un mayor estrés celular asociado y a una disminución de la autofagia eficaz, apareciendo inflamación de bajo grado. La disminución de autofagia provocará senescencia celular, mayor respuesta inflamatoria y desarrollo de un fenotipo de envejecimiento prematuro.

El envejecimiento se relaciona con:

1. Autofagia dañada:

Diversos estudios muestran la relación entre envejecimiento y el daño autofágico con estrés oxidativo aumentado, lipofuscinogénesis, daño mitocondrial y una macroautofagia disminuida [111, 112, 113, 114]. La autofagia mediada por chaperones también se ve afectada [115]. Tras estos estudios pioneros, el desarrollo de las técnicas moleculares ha seguido revelando el papel crucial de la autofagia en el control del proceso de envejecimiento de los tejidos, así como en la regulación de la longevidad del organismo [116, 117, 118].

2. Apoptosis reprimida

La proteína Bcl-2 es un importante factor antiapoptótico, existiendo una represión de la apoptosis asociada a la edad. El aumento mantenido en los niveles de Bcl-2 protege contra la apoptosis pero, al mismo tiempo, reprime la autofagia.

3. Fenotipo inflamatorio de bajo grado

El fallo del sistema inmune adaptativo durante el envejecimiento hace aumentar la activación del sistema inmune innato, provocando la aparición de un fenotipo proinflamatorio tisular. Hay mayor respuesta a estrés celular y ambiental, con estrés oxidativo y carga antigénica aumentada. Diversos estudios han observado recientemente como la expresión aumentada de genes inflamatorios es la alteración más frecuente durante el envejecimiento [119, 120], observándose también un aumento en los niveles séricos de citoquinas como IL-6, TNF- α y Proteína C reactiva [121].

Estos problemas de la autofagia asociados al envejecimiento favorecerán el desarrollo de patologías por déficit en la reparación celular. La inhibición de la autofagia produce atrofia y procesos de envejecimiento o senescencia acelerados e incluso muerte por fallo de sus componentes. La autofagia, en ocasiones, también lleva a la célula a la muerte celular, pero como mecanismo de control. Hay que considerar a la autofagia con una función de doble agente en múltiples órganos y patologías, el impacto de la autofagia es un continuo en el que existe un rango óptimo necesario para mantener la homeostasis y función celular, fuera del cual se producen los problemas.

Diversos estudios han conseguido, mediante la activación de la autofagia, mejorar la esperanza de vida en diversas especies a través de diferentes vías como mediante la restricción calórica inducido por SIRT1 [122, 123] o mediante activadores químicos de AMPK, SIRT1 e inhibidores de pMTOR como la metformina, resveratrol y la rapamicina [124, 97, 125]

Mecanismo molecular de la autofagia

Diferentes proteínas controlan el proceso de autofagia, conociendo cuáles participan en cada fase, podremos estudiar en qué punto está aumentado o bloqueado el proceso [126].

Durante la formación del autofagosoma se distinguen varias fases: Iniciación, nucleación, elongación y sellado. Tras ello, hay una maduración del autofagosoma y una fusión con los endosomas y lisosomas, degradándose el material secuestrado en los autolisosomas.

Señales intra y extracelulares van a modificar la actividad autofágica mediante diferentes vías [Figura 11]. Al someter a las células a condiciones de estrés, como la hipoxia, privación o abundancia de nutrientes, altas temperaturas, infección por patógenos y estrés oxidativo se activan proteínas reguladoras de la autofagia (mTOR, AMPK, PI3K-I, etc) que a su vez regulan la actividad del *complejo quinasa ULK* (formado por las proteínas ULK1/2, ATG13, 10, 11, 7, 18 y FIP200) [127, 128]. La activación de mTOR inhibirá la autofagia, sin embargo la activación de AMPK mejorará los niveles de autofagia mediante diferentes vías [129].

La principal proteína del complejo ULK, la quinasa ULK1, activa por fosforilación a la proteína Beclin1 (también llamada ATG6) que forma parte del complejo iniciador de la

nucleación del fagóforo, también llamado *complejo PI3K-III*, genera IP3, lo que es esencial para reclutar otras proteínas ATGs sobre las dobles membranas lipídicas provenientes del RE, complejo de Golgi y las mitocondrias. El fagóforo interacciona con el complejo proteico ATG5/ATG12 (formado por la acción previa de ATG7 y ATG10) lo que da lugar a la expansión de la doble membrana lipídica y formación del autofagosoma. Finalmente ATG 16 se une al complejo ATG5/ATG12 previo, permitiendo la formación de un gran complejo que permite la inserción de LC3II (también llamada ATG8) en la membrana del fagóforo. Esta proteína LC3 se sintetiza inicialmente en forma no procesada como pro-LC3, siendo escindida por la acción de ATG4 y generándose la forma activa LC3-I en el citosol. Posteriormente a LC3-I se le incorporan lípidos por la acción de ATG7 y ATG3, catalizando su unión a la membrana del fagóforo en forma LC3-II [130]. LC3 II, es fundamental para el cierre de la vesícula del fagóforo tras la captación de la carga y dar origen al autofagosoma. En este autofagosoma formado se libera el complejo ATG5/ATG12/ATG16 y LC3-II se libera de la membrana externa por la acción de la autofagina.

Este autofagosoma ya desnudo se fusiona con los lisosomas por la acción de las proteínas Rab7, Lamp 1 y Lamp 2, degradando la carga los enzimas lisosomales.

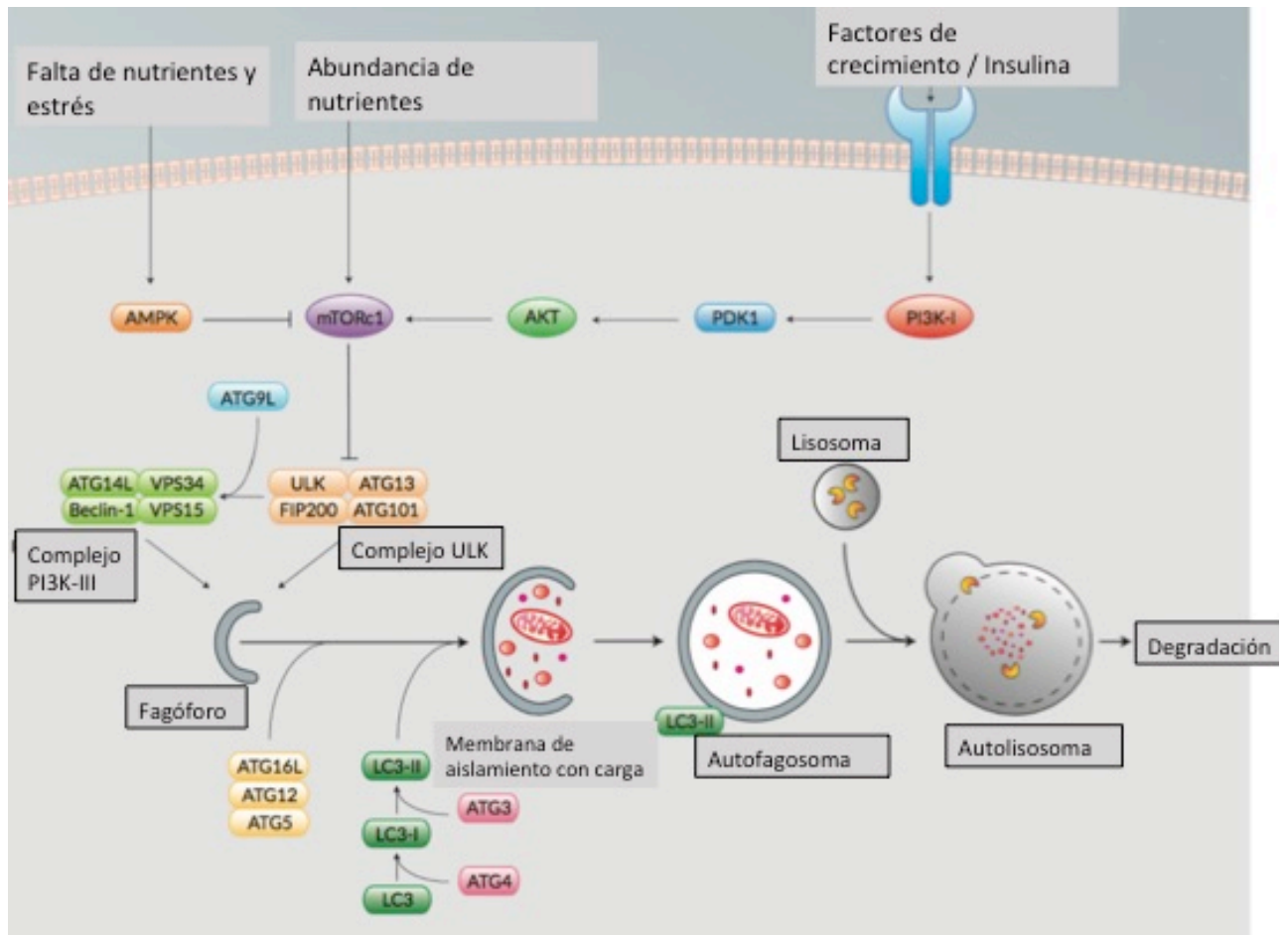


Figura 11. Control de la autofagia. Modificado de Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, et al. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol.* 2015;16:1014-24.

A nivel mitocondrial, existe una autofagia específica, conocida como **mitofagia**.

Proteínas implicadas en la eliminación autofágica como son p62/SQSTM1 y la vía PINK/Parkin destacan a la hora de valorar el proceso. Aumento de Parkin se relaciona con autofagia aumentada y ausencia de p62/SQSTM1 se relaciona con menor esperanza de vida y fenotipo envejecido prematuro debido a acumulación de mitocondrias disfuncionales por autofagia deficiente. Un aumento de p62 también se relaciona con acumulación por fallo en la vía de eliminación del flujo autofágico [131, 132]. Conociendo el mecanismo molecular de la autofagia y su importancia para el mantenimiento celular y el envejecimiento, son numerosos los estudios que buscan una mejora de la autofagia mediante su modulación, ya sea mediante modificación genética o farmacológica. La inhibición de la autofagia provocaría envejecimiento prematuro y su activación, aumento en la esperanza de vida, como con el uso de la rapamicina [133, 134, 135, 136].

¿Cómo estudiar la autofagia?

La activación, inhibición o alteración del flujo autofágico se puede investigar por diferentes métodos, lo ideal es usar técnicas complementarias ya que cada uno de los métodos tiene ventajas y desventajas. Estos métodos seguirán la formación y acumulación de autofagosomas, la fusión con los lisosomas y la degradación de su contenido. A la hora de su estudio es importante poder distinguir entre aumento o reducción del número de eventos autofágicos, y el incremento o disminución del flujo autofágico. Esta distinción se efectuará usando inhibidores de fusión o de degradación lisosomal, siempre comparándolos con un nivel basal de autofagia en condiciones carentes de estímulos.

a) *La microscopía electrónica de compartimentos autofagosomales* es la técnica “gold standard” en el estudio de la autofagia.

b) *Inmunocitoquímica e inmunofluorescencia*: Para la inmunocitoquímica se usan anticuerpos primarios específicos para proteínas LC3 y Beclin1 que están involucradas en la formación de autofagosomas, o anticuerpos específicos contra proteínas mitocondriales (PINK1) o lisosomales (LAMP1). En la inmunofluorescencia se usan, por ejemplo, constructos transgénicos insertados en las células u organismos utilizados que permiten ver la expresión de proteínas relacionadas con la autofagia, como el constructo codificante para GFP-LC3 que monitorea la inducción de la autofagia y formación de autofagosomas. En condiciones basales se observa distribuido por el citoplasma de forma uniforme, cuando se activa la autofagia se observa reclutado alrededor de la membrana fagosomal generando señales fluorescentes puntuales en la célula [137].

c) *Biología molecular para cuantificar índice de autofagia*. A nivel molecular se puede establecer el aumento o disminución de la autofagia por Western Blot. Un aumento en la proporción LC3-II/LC3-I indica aumento en el número de autofagosomas.

Estudiando la relación p62:Beclin1 tendremos un índice de la estimulación de la autofagia, disminución de p62 y aumento de Beclin1 se correlaciona con un aumento en la autofagia. Aumento de p62 determina acumulación de autofagosomas por peor flujo autofágico.

2.8 Terapias antienvjecimiento

Son numerosos los estudios que tratan de buscar terapias para mejorar el proceso de envejecimiento para conseguir una vida más longeva y mejor estado de salud en la última etapa de la vida.

Nutrición y envejecimiento

La nutrición juega un papel fundamental en el estado de salud general y mediante el control de la misma se puede realizar un control de los procesos metabólicos que se dan en el organismo y provocan alteraciones durante los procesos de envejecimiento. Ya hemos mencionado como la **restricción calórica** se ha demostrado como el tratamiento antienvjecimiento más potente en la actualidad. Disocia el complejo inhibidor entre el complejo Bcl-2/xL y Beclin 1, dejando actuar a Beclin 1 y estimulando la autofagia reparadora [138].

Estimuladores de la autofagia dependientes de Beclin 1 e independientes de Bcl-2 podrían solucionar los problemas autofágicos derivados de la edad actuando sobre la disregulación de la sensibilidad a las vías nutricionales como son **activadores de AMPK e inhibidores de mTOR**, como la Rapamicina [97], el resveratrol [124] y la metformina [139, 140]

Al considerar el estrés oxidativo como actor principal de los procesos de envejecimiento, muchos estudios han considerado que la suplementación con **antioxidantes**, [141, 142], vitamina E, C, o coenzima Q podrían ser beneficiosos [143, 144]. Estos estudios han demostrado disminución del estrés oxidativo pero no aumento de longevidad. El uso de nuevas generaciones de sustancias antioxidantes sintéticas, miméticas de SOD y Catalasa ha sido ensayado con mayor éxito en el aumento de longevidad de ratones y C.elegans [145, 146, 147].

El tipo de **grasas ingeridas** en la dieta condiciona parámetros bioquímicos en la membrana mitocondrial y en general en todas las membranas biológicas. Estas, adaptan la composición de sus fosfolípidos a la grasa ingerida por lo que un individuo que ingiera grasas animales tendrá en sus membranas más ácidos grasos saturados que otro que ingiera grasas de origen vegetal. Se han descrito adaptaciones del sistema de transporte electrónico mitocondrial en función al tipo de grasa de la dieta [148].

La respuesta al estrés oxidativo serán también diferente según la composición lipídica de las membranas biológicas, teniendo una fuente de grasa poliinsaturada (como la proveniente del aceite de girasol) tendremos membranas más susceptibles al daño oxidativo que habiendo tenido una fuente saturada (grasa animal) o monoinsaturada (aceite de oliva). Esto ha sido demostrado en situaciones fisiológicas y patológicas en diferentes modelos animales y humanos [149].

Tratamientos hormonales

También se han estudiado tratamientos con hormonas con papel geroprotector como la hormona del crecimiento, que disminuyen con la edad, pero se ha visto efectos secundarios como la mayor aparición de tumores. Otros tratamientos han sido con DHEA (Deshidroepiandrosterona), estrógenos (disminuye la ingesta de alimentos y el ritmo de crecimiento) y melatonina (tiene capacidad antioxidante y disminuye con la edad) [150, 151].

Ejercicio físico

Práctica de ejercicio físico, dentro de una normalidad fisiológica en cuanto a parámetros cardiovasculares, antropométricos, oxidativos e inmunológicos es una terapia antienvjecimiento acompañada de aumento en la autofagia reparativa.

3. ENVEJECIMIENTO CARDIOVASCULAR

3.1 Sistema Cardiovascular

En la actualidad, los accidentes cerebrovasculares y enfermedades cardiacas, junto con el cáncer, son las principales causas de muerte en el ser humano, suponiendo casi 3 cuartas partes de las defunciones mundiales. De ahí la importancia del estudio del sistema cardiovascular y sus cambios durante el proceso de envejecimiento.

El sistema cardiovascular es uno de los sistemas más complejos e importantes del organismo, conformado por el corazón y los vasos sanguíneos que se encuentran unidos formando un circuito cerrado por el que circula la sangre. El corazón es una estructura muscular con cuatro cavidades en su interior, dos superiores conocidas como aurículas y dos inferiores llamadas ventrículos conectadas por un sistema de válvulas. Está conformado por un tejido, miocardio, que actúa como un marcapasos capaz de generar actividad eléctrica que se traduce en la contracción rítmica de las aurículas y los ventrículos para impulsar la sangre por el sistema. La sangre sale del corazón por las

arterias, la arteria aorta lleva la sangre a gran parte del organismo, mientras que la arteria pulmonar la lleva a los pulmones para su oxigenación, la sangre ingresa de vuelta al corazón por las venas cavas y las venas pulmonares.

El corazón tiene una demanda energética ilimitada ya que mantiene una actividad continua de contracción y relajación. Tiene gran cantidad de mitocondrias obteniendo su energía de la fosforilación oxidativa por la oxidación completa de los combustibles. Por ello su metabolismo es aerobio y utiliza glucosa, ácidos grasos, cuerpos cetónicos y lactato. No dispone de reservas energéticas, solo una pequeña cantidad de creatina-fosfato, por lo que para mantener su actividad necesita un aporte continuo de nutrientes y oxígeno.

3.2 Enfermedades cardiovasculares y daño cardíaco

La enfermedad cardiovascular es un término amplio para referirnos a diversos problemas del corazón y vasos sanguíneos como son el infarto de miocardio, angina de pecho, accidente cerebrovascular, aneurisma, arteriosclerosis y aterosclerosis, representando estas patologías más del 30% de todas las muertes mundiales [152]. Estos problemas, con frecuencia, se deben a la **aterosclerosis**, afección que ocurre cuando la grasa y el colesterol se acumulan en las paredes internas del vaso sanguíneo, capa íntima de las paredes de arterias de mediano y gran calibre, formándose una placa de ateroma. Con el tiempo, la placa puede estrechar los vasos sanguíneos y causar problemas generalizados a todo el organismo. Si una arteria resulta obstruida, puede llevar a desencadenar un ataque cardíaco o un accidente cerebrovascular.

Las enfermedades cardiovasculares son la causa más importante de muerte a nivel mundial. Dentro de las mismas, las que representan un problema de salud más importante son **la cardiopatía isquémica y la insuficiencia cardíaca**:

La cardiopatía isquémica se debe a la disminución del flujo sanguíneo que recibe el corazón a través de las arterias coronarias como consecuencia de la **aterosclerosis** (endurecimiento y pérdida de elasticidad de las arterias). Dentro de la cardiopatía isquémica se incluye la **angina de pecho** (bloqueo parcial con reducción del flujo de sangre, los daños en el miocardio suelen ser reversibles) y **el infarto de miocardio** (trombosis coronaria con bloqueo de sangre en algún vaso del corazón dejando de llegar sangre a alguna zona del miocardio, cesando el aporte de oxígeno y nutrientes, con muerte del tejido muscular y daños permanentes en el corazón). Los principales factores

de riesgo conocidos son el tabaquismo, obesidad, diabetes mellitus, cifras elevadas de colesterol e hipertensión arterial.

La insuficiencia cardíaca ocurre cuando el miocardio se vuelve rígido o débil, no pudiendo bombear suficiente sangre oxigenada, causando síntomas en todo el cuerpo.

La **hipertensión arterial** agrava el problema, haciendo fluir la sangre con una fuerza aumentada y menor velocidad, favoreciendo el daño endotelial.

Un **accidente cerebrovascular, trombosis cerebral o ictus**, es causado por la falta de flujo sanguíneo al cerebro. Esto puede suceder debido a un coágulo de sangre, que viaja en los vasos sanguíneos hasta el cerebro o un sangrado en el mismo, formándose un trombo. El accidente cerebrovascular tiene muchos de los mismos factores de riesgo que una cardiopatía pudiendo producir parálisis cerebral o la muerte.

Autofagia cardiovascular y patologías cardíacas

La autofagia, como mecanismo de control de calidad celular, tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular y su desequilibrio contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. El envejecimiento y una dieta alta en grasas con desarrollo de obesidad son estados inflamatorios que afectaran a la autofagia y homeostasis cardiovascular, favoreciendo el daño cardíaco.

La disfunción autofágica se ha asociado al envejecimiento y obesidad con bloqueo del flujo autofágico y afectación del tejido cardíaco con acumulación de sustratos no degradados en forma de autofagosomas [153]. Actuaciones sobre procesos celulares que mejoren la autofagia podrán retrasar desarrollo de enfermedades cardíacas asociadas a la edad y a una dieta alta en grasas [154].

La autofagia en las patologías cardiovasculares:

Hipertrofia cardíaca:

Respuesta adaptativa del corazón a una sobrecarga de presión o volumen, o a la pérdida de proteínas o masa contráctil por isquemia miocárdica. Existe relación inversa entre la autofagia y la hipertrofia cardíaca, a menor autofagia, mayor hipertrofia [155].

Insuficiencia cardíaca

El miocardio hipertrofiado patológicamente por una sobrecarga de presión crónica se dilata con pérdida de funcionalidad contráctil normal provocando la

insuficiencia cardiaca. Se ha visto aumento de autofagia en insuficiencia cardiaca pero no se sabe si es como adaptación por la falta de nutrientes o como una vía alternativa de muerte en los cardiomiocitos dañados.

Isquemia-Reperusión

Hay disminución de la capacidad autofágica, conllevando un aumento del daño miocárdico. En la reperusión hay acumulación de autofagosomas pero que no parecen llegar a degradarse.

Disfunción endotelial y aterosclerosis

La enfermedad aterosclerótica se caracteriza por daño endotelial, acumulación de lípidos, infiltración de células inflamatorias y proliferación de células musculares lisas vasculares y fibroblastos. En una etapa temprana la formación de la placa ateromatosa aumenta la autofagia tratando de tener una función protectora ya que diversas moléculas, como especies reactivas del oxígeno, LDL oxidados y TNF- α , la activan para tratar de eliminar los componentes celulares dañados, sin embargo, en estados avanzados una autofagia defectuosa lleva a estrés severo a las células que componen la placa, con una hiperactivación de la inflamación que hace progresar la placa ateromatosa.

Más estudios se hacen necesarios para comprender los procesos autofágicos en las diferentes patologías del tejido cardiaco.

3.3 Envejecimiento del sistema cardiovascular

El fenotipo inflamatorio inherente al envejecimiento, así como la acumulación de productos activadores de la inflamación [156], contribuyen al desarrollo de patologías cardiometabólicas que provocan envejecimiento cardiaco. Los ancianos son, a nivel mundial, el grupo poblacional que presenta mayor enfermedad cardiovascular, llevando consigo una gran limitación funcional, con grandes costes económicos, sociales y psicológicos [157].

El medio ambiente y los estilos de vida influyen en gran medida y aceleran la aparición de enfermedades cardiovasculares y el envejecimiento del sistema. La actividad física, tabaquismo, consumo de alcohol, nutrición y la personalidad del individuo influirán en el proceso.

El envejecimiento del sistema cardiovascular incluye cambios a diferentes niveles y de diferentes tipos, aumentando de forma progresiva la **patología inflamatoria**. Las principales características del envejecimiento del sistema cardiovascular reflejan cambios anatómicos y estructurales, cambios funcionales y cambios fisiológicos [Figura 12].

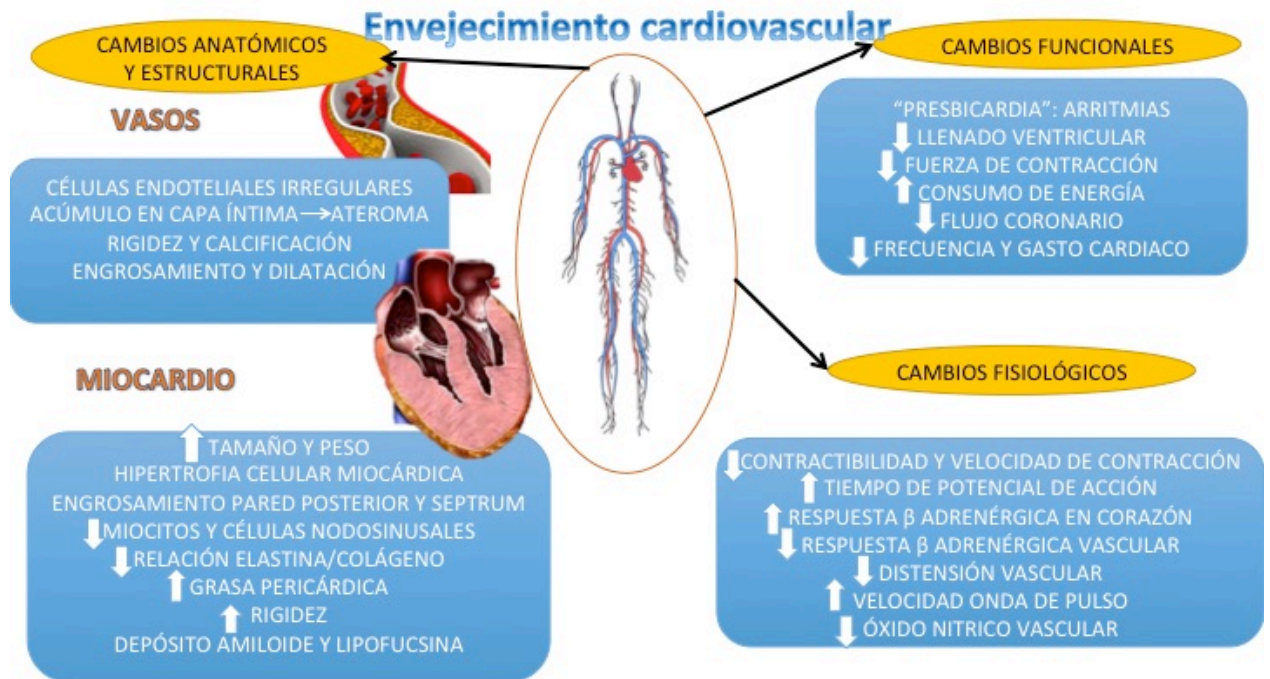


Figura 12. Envejecimiento del sistema cardiovascular

Estos cambios provocan en el corazón un incremento leve de su tamaño y peso, el ventrículo izquierdo se hipertrofia, la pared cardiaca se vuelve más gruesa, se incrementan los depósitos de lipofuscina y hay un engrosamiento y rigidez de las válvulas cardiacas apareciendo fibrosis [158]. El músculo cardiaco pierde elasticidad, bombeando menos y teniendo que hacer más trabajo para compensar esa pérdida de eficacia. Aparecen alteraciones en la frecuencia cardiaca, arritmias, por pérdida de células marcapasos, desarrollo de tejido fibroso y depósitos de grasa pericárdica [159]. A nivel celular hay disminución en el número de cardiomiocitos por mayor muerte celular por necrosis y procesos apoptóticos. Se observa disminución de óxido nítrico (vasodilatador producido por las células endoteliales que regula el tono vascular e inhibe la inflamación vascular) lo que provoca senescencia de células endoteliales [160]. Los vasos sanguíneos también adquieren menos elasticidad, la aorta se vuelve más rígida y gruesa en su pared, aumentando ligeramente la tensión arterial por

aumento de la resistencia periférica [161]. Se produce acúmulo de placas de ateroma en la capa íntima de los vasos.

La lipofuscina es un pigmento pardo-amarillento con fluorescencia propia, compuesto por un polímero de lípidos y fosfolípidos, derivado de la peroxidación de los lípidos poliinsaturados de las membranas subcelulares. Es un signo diagnóstico de envejecimiento celular originado por la acción de los radicales libres. Se acumula solamente en células envejecidas de los mamíferos, sobre todo en células diferenciadas como neuronas y células miocárdicas. Al ser producto del metabolismo oxidativo se relaciona con la teoría del envejecimiento de los radicales libres.

3.4 Dieta, envejecimiento cardiaco e inflamación

La inflamación es el factor común entre la dieta, el envejecimiento y las patologías cardíacas. Durante el envejecimiento, hay un aumento en la producción de radicales libres del oxígeno, consecuentemente mayor estrés oxidativo que afecta a las células cardíacas y aumento en la senescencia y muerte de cardiomiocitos, conformando un estado proinflamatorio en un corazón envejecido [162].

Las enfermedades cardiovasculares por daño cardíaco tienen una enorme importancia social al ser la primera causa de mortalidad en los países desarrollados. Estas enfermedades se han asociado a un estilo de vida con hábitos poco saludables y patrones de dieta occidental [163]. El abuso de alimentos precocinados, con alto contenido en grasas y aditivos potenciadores del sabor, así como la falta de productos frescos, como frutas y verduras, son los principales factores de riesgo cardiovascular en la dieta de estos países. Estas dietas hipercalóricas contribuyen al desarrollo de patologías inflamatorias, agravando los problemas naturales del envejecimiento y facilitando la aparición del daño cardíaco [164]. Para prevenir la aparición de estas enfermedades cardiovasculares se recomienda controlar la calidad y cantidad de grasa, representando un 25-30% del total de calorías y tratando de ingerir grasas insaturadas, disminuir alimentos que aumenten el colesterol y reducir el contenido de sodio (2-3 gr/día) para prevenir acumulación de líquidos y desequilibrio electrolítico.

La inflamación actúa como nexo de unión entre una dieta hipercalórica y el daño cardíaco producido durante el envejecimiento [165]. Durante el desarrollo de la aterosclerosis, en el inicio de la lesión con la formación de la estría grasa, tienen gran

importancia mediadores inflamatorios que favorecen la entrada de las LDL en la íntima arterial como son TNF- α , IL-1 β , factor de crecimiento derivado de plaquetas, adrenalina y noradrenalina. Las LDL oxidadas, atraen leucocitos plasmáticos, adentrándose en la pared arterial donde una vez diferenciados a macrófagos proinflamatorios inician la respuesta inflamatoria del proceso. Tras la formación de la “estría grasa”, la lesión avanza hasta la formación de la placa de ateroma, llegando en los estadios finales de la enfermedad a la necrosis de diversos tipos celulares por acumulación de sustancias tóxicas y a la calcificación, lo cual contribuye a una rigidez y trombogénesis final.

En el proceso, es destacable el papel que tienen los ácidos grasos que integran las membranas fosfolipídicas de las células presentes en la lesión ateromatosa, determinado por la cantidad y calidad de los lípidos de la dieta. Los lípidos son nutrientes fundamentales para el funcionamiento del organismo, tanto como fuente de energía como parte de las membranas celulares y otros componentes esenciales. Su longitud y grado de insaturación definen el tipo de ácido graso, qué efectos metabólicos tienen y su papel modulador en los niveles del colesterol sanguíneo y de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, de ahí la importancia de la cantidad y calidad de la grasa ingerida en la dieta.

Los ácidos grasos saturados (presentes en grasas animales, algunos aceites vegetales, grasa de la leche y derivados lácteos) provocan incremento de niveles séricos de colesterol total y de las LDL específicamente, siendo factor de riesgo de daño cardíaco y enfermedades cardiovasculares. Su sustitución por grasas mono y poliinsaturadas provoca descensos en niveles de colesterol plasmático y LDL, aumentando las HDL.

Las grasas consumidas en la dieta se ven reflejadas también en la composición de las lipoproteínas plasmáticas por lo que la dieta es el principal factor exógeno que influye en la composición lipídica de la sangre. Las grasas de origen animal aportan muchos AGS, aumentando los niveles séricos de colesterol. Sin embargo, el aceite de oliva, rico en AGMI disminuye las LDL y aumenta las HDL, ayudando a controlar el colesterol. Los aceites vegetales ricos en AGPI n-6 reducen LDL y HDL, por mayor degradación a nivel hepático, aconsejándose un uso moderado de éstos. Los AGPI n-3 procedentes del pescado, reducen triglicéridos sanguíneos y las LDL cuando están elevados en suero, siendo beneficiosos en los pacientes con problemas cardiovasculares [14].

Las LDL transportan el colesterol desde el hígado a los tejidos del organismo (“colesterol malo”), las HDL (“colesterol bueno”) transporta el colesterol de los tejidos al hígado para metabolizarlo y eliminarlo, siendo beneficioso.

En un análisis sanguíneo, LDL debe ser menor a 150 mg/dl y HDL mayor a 35 mg/dl. LDL a partir de 180 mg/dl aumenta el riesgo cardiovascular, a partir de 200 mg/dl se considera factor de riesgo importante.

La **dieta mediterránea** con mayor consumo de frutas y verduras frescas, donde la principal fuente de grasa es el aceite de oliva, se ha demostrado beneficiosa para evitar la aparición de daño cardíaco. Hay que tratar de disminuir la ingesta de grasas en la dieta, siendo éstas preferiblemente insaturadas en vez de saturadas. Esta dieta es típica de los países del sur de Europa, desarrollados alrededor del mediterráneo, que aún a las recomendaciones nutricionales ya vistas. Elevado consumo de aceite de oliva, frutas y vegetales frescos, legumbres, cereales y pescado, seguido de una baja ingesta de carnes y grasas saturadas, azúcares simples y lácteos, con moderada ingesta de alcohol. Esto implica menos grasas saturadas, más alimentos naturales, fibra y sustancias antioxidantes, con menor ingesta de proteínas, azúcares y alcohol, mejorando la salud cardiovascular. Numerosos estudios demuestran cómo esta dieta, previene enfermedades cardiovasculares y degenerativas, generando mayor esperanza de vida [166].

3.5 Obesidad y daño cardíaco

El desarrollo de obesidad y síndrome metabólico por fallo nutricional y malos hábitos de vida, condicionado, en menor medida, por los genes, conllevará la aparición y desarrollo acelerado del daño cardíaco y patologías cardiovasculares consecuentes, con la inflamación con un papel principal en el desarrollo del proceso [Figura 13].

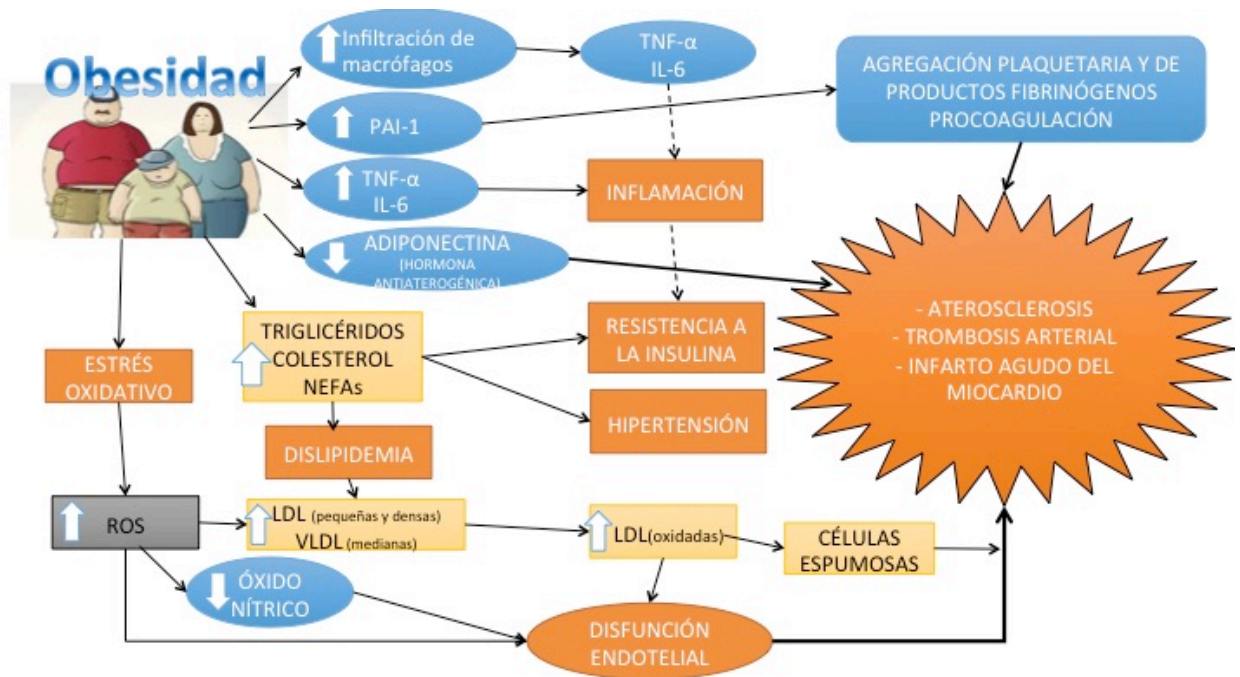


Figura 13. Obesidad y patología cardiovascular.

El exceso de grasas saturadas proveniente de la dieta genera un mayor reclutamiento de macrófagos por el tejido adiposo y una mayor liberación de ácidos grasos no esterificados (NEFAs), citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6), especies reactivas de oxígeno generadoras de estrés oxidativo, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) ricas en colesterol y lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox). A su vez, también desencadena una disminución de adiponectina y óxido nítrico, lo que favorece el avance de los procesos inflamatorios a nivel local y sistémico, por el reclutamiento de macrófagos, la disfunción endotelial y el desarrollo final de daño cardíaco y enfermedades cardiovasculares.

El PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno-1) es el principal inhibidor del activador tisular del plasminógeno y la uroquinasa, responsable de la fibrinólisis (eliminación fisiológica de los trombos de la sangre). El aumento de PAI-1 provocará menor fibrinólisis, con mayor riesgo de agregación plaquetaria y de productos fibrinógenos procoagulantes propiciadores de la trombogénesis.

Las células espumosas aparecen también en la pared de vasos sanguíneos formando una veta de grasa. Son derivadas de macrófagos y células musculares lisas de la pared arterial, siendo el inicio de la formación de la placa de ateroma.

Por todo lo analizado, la enfermedad cardiovascular, principal causa de muerte en los países desarrollados, es una línea de investigación de gran interés científico. Como hemos visto, las células inflamatorias derivadas de la sangre, monocitos/macrófagos, tienen una función primordial en el desarrollo de este proceso, por lo que el **control de los procesos inflamatorios** es una opción terapéutica importante a desarrollar. La terapia nutricional, junto con la intervención farmacológica y quirúrgica, se plantea primordial en esta patología.

4. INFLAMACIÓN Y PATOLOGÍAS INFLAMATORIAS. INFLAMASOMA

4.1 SISTEMA INMUNE

El sistema inmune conforma la defensa natural del cuerpo para discriminar entre lo propio y lo extraño, reconociendo y eliminando estructuras extrañas al organismo, siendo la base de los mecanismos inmunitarios.

La presencia de estructuras extrañas en los tejidos activa mecanismos de reconocimiento, humorales (quininas, complejo del complemento) o celulares (células portadoras de pattern recognition receptors, PRR) que inician la reacción inflamatoria. La función defensiva de la inflamación trata de focalizar elementos defensivos en el tejido donde se requiera.

Los signos de la inflamación son consecuencia de las alteraciones vasculares, que conllevan extravasación de plasma y salida de leucocitos, descrito tradicionalmente como:

- Tumor: Hinchazón o edema por el plasma extravasado.
- Rubor: Enrojecimiento por vasodilatación y mayor flujo sanguíneo.
- Dolor: Por la presión del edema y liberación de mediadores químicos.
- Calor.

Además de por un proceso infeccioso, mediante señales asociadas a patógenos, el proceso inflamatorio puede originarse debido a diferentes señales de peligro asociadas a daño. Al acumular células defensivas, con potencial agresivo, y capaces de generar radicales oxidantes, se produce también daño a las células del propio tejido

donde actúen, por lo tanto pese a su carácter defensivo, hay que tener en cuenta los **aspectos negativos** asociados a un proceso inflamatorio.

La **fagocitosis** es el proceso por el cual células y organismos unicelulares capturan y digieren partículas sólidas introduciéndolas al interior celular. Los neutrófilos son las primeras células que llegan al foco de inflamación, especializados en eliminar partículas extrañas mediante fagocitosis. Los macrófagos, que provienen de la maduración de monocitos, son también especialistas en fagocitar. La eficacia de la fagocitosis (inmunidad innata) se incrementa con la participación de los anticuerpos (respuesta inmune específica).

Los fagocitos infiltrados en un tejido inflamado, como son los macrófagos, producen citoquinas proinflamatorias para mejorar los mecanismos defensivos a nivel sistémico. Las citoquinas producidas por células del linaje de los monocitos se conocen como monoquinas. Existen tres monoquinas proinflamatorias que son pirógenos endógenos e inductores de fase aguda: TNF, IL-1 e IL-6. Elevados valores de estas citoquinas son un indicador de inflamación con importante valor clínico.

4.2 INFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso complejo, presente como respuesta, tanto a infecciones, como a una variedad de estímulos que pueden generar lesión tisular (traumáticos, tóxicos, isquémicos, autoinmunes, etc...). Los agentes causales pueden ser de origen biológico, químico o físico. Para ser beneficiosa, esta respuesta inflamatoria ha de ser breve y localizada en el sitio donde se produzca el daño. En caso de extenderse o alargar su duración será patogénica, pudiendo convertirse en un proceso sistémico y/o crónico.

Por tanto, la inflamación aguda es una respuesta contra la infección y el daño tisular para limitar así la afectación que sufre el organismo [167]. Sin embargo, cuando esta inflamación aparece de manera no regulada y crónica puede desembocar en patologías autoinmunes y determinadas lesiones.

La inflamación aguda local ocurre en la microcirculación y se caracteriza por el paso de proteínas plasmáticas y leucocitos de la sangre a los tejidos. El proceso lo regulan sustancias secretadas por mastocitos, basófilos, plaquetas, células fagocíticas y endoteliales:

- A) *Mediadores de la inflamación*: Como histamina, serotonina, bradicinina, eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos), quimiocinas, enzimas (triptasas y demás proteasas), factor activador de plaquetas, fibrina, C3a, C5a.
- B) *Citoquinas*: Tempranas o de alarma (IL-1, IL-6, TNF). Son las que conducen el proceso. También hay citoquinas quimioattractantes (IL-8), inductoras de la respuesta linfocítica (IL-12, IL-18) y supresoras del proceso (IL-10, TGF β).

En el caso de inflamación sistémica, la respuesta de fase aguda es inducida principalmente por citoquinas IL-1, IL-6 y TNF. Hay liberación en grandes cantidades actuando en diversos órganos y existiendo afectación sistémica.

Inflamación en la obesidad y enfermedades metabólicas

La obesidad y enfermedades metabólicas, consecuentes a una mala alimentación, hábitos de vida poco saludables y factores ambientales o genéticos desfavorables, conllevaban un estado proinflamatorio sistémico.

El desarrollo de obesidad se asocia a una hipertrofia del tejido adiposo con aumento de triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres y esteroideos, así como a la presencia de especies reactivas del oxígeno generadoras de estrés oxidativo y aumento de mediadores de la inflamación como son los macrófagos precursores de interleuquinas. Todas estas sustancias activan el proceso inflamatorio conllevando una inflamación sistémica de bajo grado con desarrollo de patologías consecuentes.

La dermatitis ulcerosa es una lesión inflamatoria de etiología desconocida pero característica de personas obesas envejecidas [168].

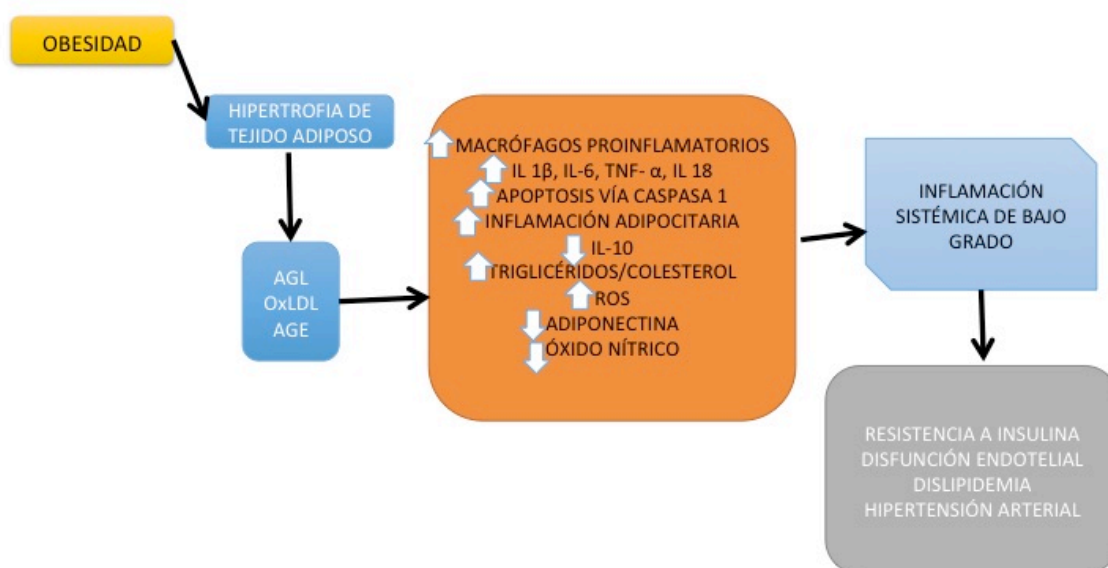


Figura 14. Papel de la inflamación en la obesidad y enfermedades metabólicas

Efecto de la dieta en la inflamación y el envejecimiento

Una **dieta hipercalórica** continuada, característica de las dietas occidentales actuales de los países desarrollados, provocará hipercolesterolemia, aumento de triglicéridos y ácidos grasos libres y esteroideos. El exceso de ATP provocará un esfuerzo y daño mitocondrial con aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y estrés oxidativo consecuente. Todo ello es reconocido por la respuesta inmune innata como patrones moleculares asociados a daño y activa los procesos inflamatorios a nivel sistémico.

Así mismo, el estado proinflamatorio con inflamación sistémica, asociada al **envejecimiento**, se observa en múltiples órganos, así como en tejido adiposo y sistema nervioso central. Parece ser un mecanismo común provocado por varios desórdenes que afectan negativamente a la calidad de vida de las personas de edad avanzada. Los mecanismos por los que se produce esta inflamación sistémica desadaptativa en ausencia de infección observada durante el envejecimiento siguen siendo motivo de estudio [169, 170, 171].

La inflamación puede ser activada por patrones moleculares asociados a daño o agresión (DAMPs) como son los ácidos grasos, lipotóxicos, ceramidas, colesterol libre, ácido úrico, ATP y especies reactivas del oxígeno. Muchos de estos DAMPs se elevan durante el envejecimiento, lo que podría conducir a la inflamación sistémica

mencionada. La inflamación relacionada con el envejecimiento en múltiples órganos también podría deberse al declive funcional, incluso en ausencia de una enfermedad específica.

La dieta hipercalórica mencionada, típica de países desarrollados, también se asocia al desarrollo de estos DAMPs por lo que junto con el envejecimiento, acelerará el efecto de los procesos inflamatorios y representará un factor de riesgo muy significativo para muchas enfermedades crónicas como patologías cardiovasculares, diabetes, aterosclerosis, demencia, artritis y cáncer.

4.3 COMPLEJO INFLAMASOMA

Es un complejo citoplasmático, no delimitado por ninguna membrana y dinámico, formado por varios grupos proteicos. Actúa como importante sensor innato de patrones moleculares asociados a daños y patógenos, responsable de la activación de los procesos inflamatorios. Comprende un sensor intracelular, por lo general un receptor Nod-like (NLR), el precursor de la pro-caspasa-1 y el adaptador de ASC. Su activación conduce a la maduración de la caspasa-1 y el procesamiento de sus sustratos, IL-1 β e IL-18 [172, 173].

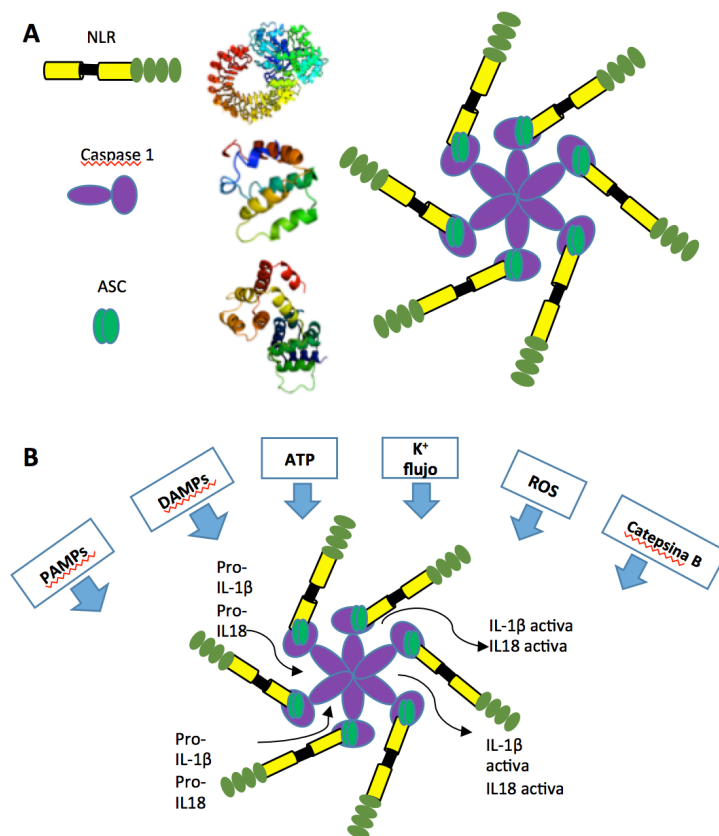


Figura 15. (A) Estructura del inflammasoma. (B) Señales de activación del inflammasoma

1) **Integrantes de la familia NLR** (NOD- like receptors) activados, con dominios pirina. El receptor NLR posee subfamilias NLRP que diferenciará tipos de inflammasoma como es el NLRP1 o NLRP3 [174].

De todos los NLRPs, NLRP3 ha sido el más estudiado y se activa por la más amplia gama de señales de peligro y estrés. El inflammasoma NLRP3 es único entre los sensores de la inmunidad innata, ya que puede ser activado en respuesta a una gran variedad de “señales de peligro”, tanto de naturaleza patógena (PAMPs), como metabólicas y endógenas, en ausencia de infección (DAMPs). Controla la activación de la caspasa-1, que a su vez estimula la secreción de precursores de IL-1 β e IL-18 para regular la inflamación asociada a patologías diversas como la obesidad y los procesos asociados a envejecimiento [175, 176, 177].

Cada NLR tiene tres dominios característicos:

- a) Dominio efector N-terminal, responsable de la señal, la transducción y la activación de la respuesta inflamatoria.
- b) Vinculación de un nucleótido central y oligomerización (NOD) que participa en la regulación del ensamblaje.
- c) C-terminal de repetición rica en leucina (LRR), responsable de la detección del ligando y autoinhibición. Por tanto, implicado en la recepción directa o indirecta de la señal activadora del inflammasoma.

2) **ASC**

Proteína tipo punto asociada con la apoptosis y con un dominio de reclutamiento y activación de caspasa. Cuando se recibe la señal activadora, los sensores del inflammasoma reclutan procaspasa-1, y para ello necesitan una proteína adaptadora con un dominio CARD (dominio de activación y reclutamiento de caspasa), siendo esta proteína ASC. Su participación es necesaria para que NLRP3 active a la caspasa-1 [178, 179].

3) **Procaspsa 1**

Como en el caso de otras caspasas, la caspasa-1 es sintetizada como procaspasa inactiva, y se convierte en la forma activa tras su dimerización controlada en los inflammasomas. Esta forma activa de la caspasa 1 provoca el cambio de Pro interleuquinas 1 β y 18 en IL-1 β y IL-18, para liberar a la circulación citoquinas

proinflamatorias, como son IL-1 β , IL-18, IL-33 y alarminas, produciendo la inflamación. La caspasa 1 también desarrolla la piroptosis, siendo un proceso de muerte celular programada independiente, diferente a la apoptosis. Este tipo de muerte celular se produce durante infecciones microbianas y combina características de la apoptosis (fragmentación del ADN) y de la necrosis (inflamación y liberación de citoquinas) [180].

ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO INFLAMASOMA

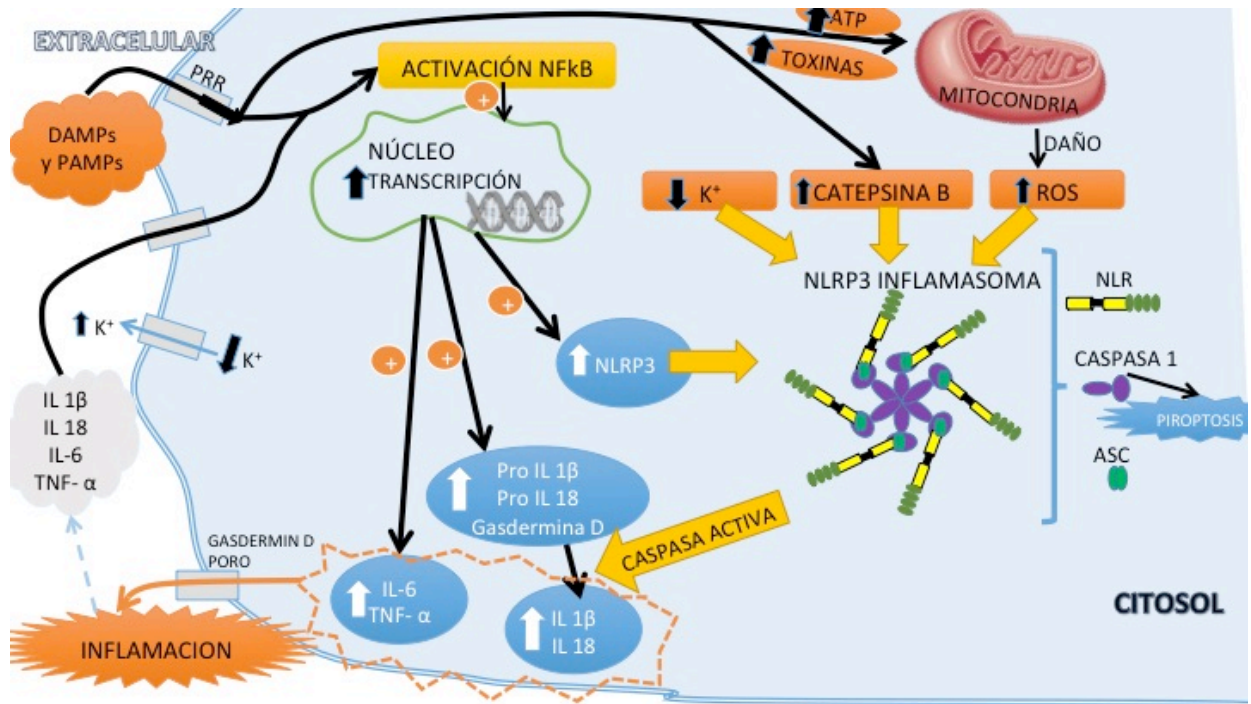


Figura 16. Activación del complejo inflamasoma e inicio del proceso inflamatorio

La inflamación se inicia por la recepción de señales de daño agudo, o cambios en el estado de reposo u homeostasis celular. El proceso empieza cuando, en un primer momento, PAMPs y DAMPs del espacio extracelular son reconocidos por los receptores de membrana celular (PRR), provocando la activación [181].

-Los **PAMPs** son *patrones moleculares asociados a patógenos*, se relacionan con ataques microbiológicos y se encuentran fundamentalmente en microorganismos, ofreciendo la posibilidad de detectar patógenos de forma específica en los tejidos [182].

- Los **DAMPs**, son *patrones moleculares asociados a daño*, provienen de problemas no relacionados con ataques microbiológicos. Son señales endógenas, derivadas del propio huésped y liberadas como resultado de perturbaciones en la homeostasis tisular producida por agresiones microbianas y no microbianas. De esta

manera se lleva a cabo el control y reconocimiento de los tejidos estresados [183]. A su vez, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-18 pueden ser reconocidos por receptores de citoquinas de membrana. Ambos estímulos activan NF-kB, configurando lo que sería la **1ª señal del proceso o “priming”**.

NF-kB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN [184]. NF-kB se encuentra en la mayoría de tipos de células animales y está implicado en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés, las citoquinas, radiación ultravioleta, LDL oxidadas y antígenos bacterianos o virales. La regulación defectuosa de NF-kB se relaciona con cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, shock séptico, infecciones virales o un desarrollo inmune inadecuado [185]. Esta activación de NF-kB provoca un aumento en la transcripción de ciertas secuencias de ADN nuclear a ARNm que codifica para NLRP3, Pro IL-1 β y Pro IL-18, IL-6, TNF- α y Gasdermina D. Aumentando los niveles de los mismos.

Los DAMPs, como son las toxinas, ATP en exceso y demás situaciones estresantes para la célula provocan durante el proceso:

- Daño mitocondrial con aumento en la producción de sustancias reactivas del oxígeno [186, 187].
- Aumento en niveles de catepsinas lisosomales citosólicas como catepsina B.
- Reducción intracelular de la concentración de K⁺ por activación del flujo de salida del ion K⁺.

Estos PAMPs y DAMPs provocan la activación del complejo inflamasoma NLRP3 (**2ª señal de activación, activación por formación del complejo inflamasoma**) que, a través de la caspasa activa, media la escisión de Pro IL-1 β , Pro IL-18 y Gasdermina D, favoreciendo la formación del poro de salida Gasdermina D y la forma activa IL1 β e IL18, que junto a IL-6 y TNF- α (producidos directamente por activación de NFkB) salen al medio extracelular y extienden el proceso inflamatorio [188].

La caspasa 1 activada media también el proceso de **piroptosis**, tratándose de muerte celular programada de tipo inflamatoria dependiente únicamente de la enzima caspasa 1, siendo un mecanismo importante de defensa contra infecciones microbianas.

Las caspasas escinden y activan la gasdermina-D, causando la muerte de la célula. Se produce una ruptura en la membrana celular, liberando los componentes celulares y las interleuquinas activas. La caspasa no está involucrada en la muerte celular apoptótica, en ese caso, su papel es procesar y activar los precursores de las citoquinas inflamatorias [189].

Inflamasoma y su papel en las patologías inflamatorias

Los procesos mediados por los inflamasomas son cruciales tanto durante las infecciones microbianas, como en la regulación de procesos metabólicos y respuestas inmunes [173,180, 190].

Las investigaciones actuales se centran en analizar el papel del complejo inflamasoma NLRP3 en la modulación de diferentes patologías inflamatorias como son la obesidad y enfermedades metabólicas, las patologías cardiovasculares y el envejecimiento junto con las patologías asociadas al mismo. Todos estos procesos conllevan un estado inflamatorio tras el reconocimiento por parte del organismo de situaciones de peligro que median la activación del inflamasoma NLRP3. El estudio en profundidad de estos procesos busca conocer todas las vías y procesos moleculares que se dan para poder encontrar nuevas dianas y vías terapéuticas que frenen la progresión de las patologías consecuentes [191]. La inhibición de NLRP3, se plantea como una de las principales estrategias para combatir los procesos autoinmunes e inflamatorios [192].

En la patogénesis de la **obesidad** y enfermedades metabólicas tiene un papel fundamental la inflamación derivada de la activación del complejo inflamasoma NLRP3. Una ingesta calórica excesiva crónica provoca mayor infiltración de macrófagos con producción de citoquinas proinflamatorias, exceso de ATP con daño mitocondrial y mayor producción de especies reactivas del oxígeno, todo ello activará la respuesta inmune innata de NLRP3 [165]. Estudios con desarrollo de obesidad en ratones deficientes de NLRP3 con una dieta alta en grasas observaron un efecto protector para la aparición de resistencia a la insulina y aumento de peso. El fenotipo metabólico y molecular estudiado, revela un papel fundamental del inflamasoma en el control del gasto energético y el desarrollo de obesidad, sugiriendo la inhibición del inflamasoma como estrategia terapéutica ante la obesidad [193, 194].

En el daño cardíaco y afectación vascular presente en las **patologías cardiovasculares** también tiene un papel fundamental la inflamación activada por el

complejo inflammasoma NLRP3. La formación de placas de ateroma como inicio de la aterosclerosis, senescencia de cardiomiocitos y células endoteliales, hipertrofia ventricular, y demás características presentes en estas patologías, tienen una base inflamatoria donde NLRP3 es crucial [195, 196].

El **envejecimiento** es el mayor factor de riesgo para desarrollar patologías crónicas inflamatorias. Con la edad aumentan los DAMPs que activan NLRP3 inflammasoma (ATP extracelular, exceso de glucosa, ceramidas, cristales de colesterol, ácido úrico, depósitos amiloides, catepsina B, etc...). Esto se acompaña de una autofagia disminuida con alteración de la homeostasis celular, agregación de proteínas, mitocondrias disfuncionales, aumento de ROS, estrés oxidativo y aumento de TNF. Todo ello activa el inflammasoma participando en los procesos degenerativos con un estado inflamatorio asociado a la edad [185, 197, 198].

Debido al papel crucial del inflammasoma en el desarrollo de la inflamación en estas patologías, diversos estudios analizan NLRP3 inflammasoma como diana terapéutica para evitar enfermedades crónicas asociadas al proceso de envejecimiento, bien dietética o farmacológicamente, se estudia la reducción en su activación con el fin de disminuir patologías crónicas y mejorar la salud [191, 199].

En el estudio de esta inflamación durante el envejecimiento, es importante analizar la variable de la **dieta**. La relación entre las células de la inmunidad innata y el metabolismo energético de la dieta es importante para regular la homeostasis celular y las enfermedades crónicas derivadas del envejecimiento. Macronutrientes de la dieta o metabolitos de vías endógenas pueden regular el inicio y duración de la respuesta inflamatoria actuando como DAMPs para la activación de NLRP3. Varios estudios han observado cómo, a través de componentes dietéticos, se produce modificación de los niveles autofágicos y de la activación del inflammasoma NLRP3. El estudio y regulación de estas interacciones inmunometabólicas son fundamentales para controlar los mecanismos de las enfermedades crónicas, con capacidad para reducir la patología y mejorar la calidad de vida en personas de edad avanzada mediante intervenciones dietéticas moduladoras de estas enfermedades inflamatorias estériles [200, 201].

Una dieta estándar, como la utilizada en la mayoría de los estudios, no se corresponde con la realidad de los países desarrollados, cada vez más caracterizada por dietas hipercalóricas con altos contenidos en grasas. El exceso calórico y de tejido adiposo, incrementan la activación del inflammasoma y trastornos inflamatorios causantes

de patología durante el envejecimiento. Sociedades occidentales, con dietas hipercalóricas, han demostrado un envejecimiento acelerado con mayor estado proinflamatorio y estrés metabólico [202].

Numerosas vías de investigación están desarrollándose al respecto para encontrar vías terapéuticas que modulen NLRP3 inflammasoma. Entre otras, se están estudiando pequeñas moléculas inhibitorias de NLRP3, MCC950 [203] con buenos resultados hasta el momento en condiciones normales y ante la utilización de dietas obesogénicas [204].

4.4 MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA E INFLAMASOMA

Las alteraciones, ya descritas, que se dan en el proceso de autofagia, van a conllevar acúmulo de desechos, reconocidos por receptores celulares asociados a daño (DAMPs), respondiendo a situaciones de estrés y conllevando una activación de los inflammasomas. Este deterioro de la autofagia aumenta la producción de ROS por parte de las mitocondrias, desencadenando activación del inflammasoma y respuesta inflamatoria. La autofagia tiene un feedback negativo con la activación de inflammasoma y consecuente inflamación (a mayor autofagia, menor activación de inflammasoma e inflamación y viceversa).

Existen diferentes moduladores de la autofagia, mediante su estudio podremos valorar el proceso e intervenir en el mismo:

Beclin 1 es una multiproteína que controla el inicio de la autofagocitosis y fases de la endocitosis. Se ha demostrado como Beclin 1 participa en la regulación de los procesos de autofagia y apoptosis que conllevarán la activación del inflammasoma. Las alteraciones en Beclin 1 influyen en la autofagia, pudiendo tener un impacto crucial en el proceso de envejecimiento. A mayor activación de Beclin 1, mayor actividad autofágica. Estudios knockout con ratones transgénicos demuestran que la falta de genes de autofagia como son Beclin 1, ATG5, ATG7 y ATG12 provocan fenotipo de envejecimiento prematuro por déficit de autofagia [205].

Teniendo en cuenta varios estudios, se ha visto que los cambios transcripcionales en el gen Beclin1 con el envejecimiento, son específicos de cada tejido y dependen del contexto, como ejemplo, en corazón se vio aumentar y en otros tejidos disminuir.

También se ha visto que no siempre los niveles de ARNm de Beclin 1 se correlacionan con los niveles de proteína funcional. Los factores epigenéticos pueden generar

respuestas específicas de tejido durante el envejecimiento y la longevidad inducida por inanición [206].

Proteínas **Bcl2** anti-apoptóticas pueden interactuar con Beclin 1 e inhibir la autofagia formando un complejo inhibitorio. La disociación de Beclin 1 de Bcl-2 se requerirá para inducir la autofagia. Una sobreexpresión de Bcl-2/xL inhibe la autofagia y la apoptosis.

Bax y **BH3** son dos familias homólogas, reguladores pro-apoptóticos. Bax interacciona con Bcl-2 y la relación BAX/ Bcl-2 se descubrió clave al analizar la susceptibilidad a la apoptosis. Un ratio elevado BAX/ Bcl-2 reflejará una apoptosis elevada.

Los receptores IP3 están implicados tanto en la supresión como aumento de la autofagia. El receptor **IP3R** es el objetivo de unión de la proteína Bcl-2, siendo el lugar de ensamblaje para el complejo Bcl-2/Beclin 1 en el Retículo endoplasmático. Bcl-2 a través de su dominio BH4 interactúa con IP3R. Es un regulador negativo endógeno de la autofagia, a más activación de receptores IP3, menos autofagia. La inhibición de IP3R, hace aumentar la autofagia porque detiene el ensamblaje del complejo inhibitorio entre Bcl-2 y Beclin 1 que depende de IP3R. Al inhibirlo, Bcl-2 no hace su efecto antiapoptótico y permite la autofagia de Beclin1.

Situaciones de estrés relacionadas con la edad (estrés genotóxico, metabólico y ambiental) van a estimular la señalización de NF- κ B, induciendo la expresión de Bcl-2 y aumentando la resistencia a la apoptosis. También se reduce la autofagia mediante el interactor Beclin1 represivo. La autofagia defectuosa característica del envejecimiento afecta a la mitofagia, que produce ROS, altera la homeostasis del Ca^{2+} y produce agregación de proteínas. Consecuentemente, estos DAMPs celulares activan el inflamasoma NLRP3 y desencadenará la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1 e IL-18) con el fin de mejorar la defensa celular, pero se desencadena una respuesta de retroalimentación positiva. Estos efectos aumentan aún más la resistencia a la apoptosis y provocan descenso de autofagia, manteniendo situación inflamatoria en los tejidos. Las células no mueren pero tampoco se reparan por autofagia reprimida.

Por tanto, el deterioro celular progresivo relacionado con la edad es inducido por una crisis en los mecanismos de defensa que involucran ciclos positivos en el equilibrio entre la apoptosis, autofagia y las respuestas inflamatorias.

La autofagia, reducida y dañada, conlleva estrés celular, acúmulo de residuos, alteraciones metabólicas y consecuente activación del inflammasoma, que activa mecanismos de defensa celular y alertan al sistema inmune innato [Figura 17].

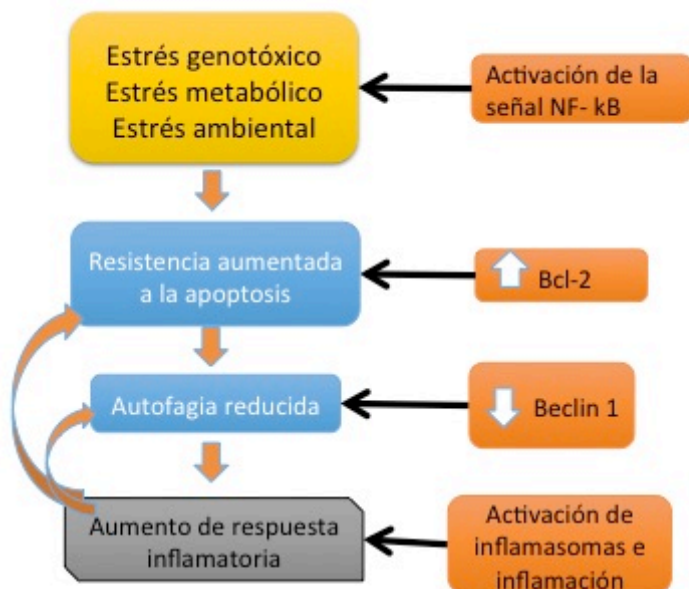


Figura 17. Autofagia e inflammasoma. Interacción del interactoma Beclin-1 y Bcl-2. Modificado de Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: Impact on the aging process. *Ageing Res Rev.* **2013**;12:520-34.

Nodos reguladores de la autofagia

La investigación ha permitido identificar vías de señalización en la vía autofágica, susceptibles de modulación con repercusión en la activación de las respuestas inflamatorias [Tabla 2].

Tabla 2. Nodos reguladores de la autofagia

Vía de señalización	Agente terapéutico	Autofagia
AMPK	Metformina (activador)	Activación
mTOR	Rapamicina (inhibidor)	Inhibidor
Sirtuina (Remodelador de cromatina)	Resveratrol (activador)	Activación

IGF1	Restricción calórica (inhibe)	Activación
ATG12, ATG5, Beclin1	Doxorubicina (inhibe)	Inhibición

El estudio de sirtuinas, AMPK activada, IGF1 y mTOR juegan un papel fundamental para regular la autofagia y salud cardiovascular durante el envejecimiento. El aumento de la población anciana y la esperanza de vida en los últimos años asociado a que las patologías cardíacas son la principal causa de muerte hacen fundamental las investigaciones al respecto [207].

Existe por tanto, una relación clara entre la dieta, las patologías inflamatorias y el envejecimiento con sus patologías asociadas, destacando las cardiovasculares, teniendo el complejo inflamasoma NLRP3 un papel fundamental en el desarrollo de estos procesos patológicos relacionados con la edad y desórdenes metabólicos. En este trabajo, evaluaremos la relación de la dieta hipercalórica, característica de dietas occidentales en países desarrollados, y del complejo inflamasoma NLRP3 en el proceso de envejecimiento centrándonos en el estudio de la función cardíaca como principal causa de muerte en países desarrollados [Figura 18].



Figura 18. Bloques de estudio y su interrelación

II. HIPÓTESIS DE ESTUDIO

El descubrimiento del inflamasoma como un complejo proteico que controla el procesamiento de IL-1 β e IL-18 constituye un hito en el campo de la inmunidad innata. Aún faltan por conocer más detalles acerca de los mecanismos que permiten la regulación bioquímica y genética de estos complejos proteicos y su papel e importancia en la etiología de enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento como las patologías cardiovasculares.

Así mismo, la dieta influye en la activación de este complejo inflamasoma. Una mala alimentación, con dieta grasa continuada y desarrollo de obesidad provoca hipertrofia de tejido adiposo con aumento de ácidos grasos libres, esteroideos y LDL oxidadas. Estas sustancias, son reconocidas por proteínas de membrana celular y activan el complejo inflamasoma conllevando inflamación sistémica de bajo grado. Esta dieta hipercalórica también provoca daño mitocondrial secundario, con estrés metabólico y aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y consecuente activación del complejo inflamasoma e inflamación sistémica incrementada.

Se ha descubierto que la mutación en ciertos genes del inflamasoma en humanos es la causa de varias enfermedades hereditarias autoinmunes, y que éstas pueden ser tratadas mediante la neutralización de IL-1 β . Esto nos muestra el potencial de los efectos negativos que produce la hiperactivación del complejo objeto de estudio. Es por ello que pensamos adecuado plantear un estudio en modelos animales con delección de genes concretos y su comparación con grupos control.

Nuestra hipótesis plantea que la ausencia del gen NLRP3 aportaría una protección a los efectos del envejecimiento, incrementados por la ingesta de dietas hipercalóricas. La delección del gen NLRP3, fundamental para el correcto funcionamiento del inflamasoma, modificará las vías de desarrollo de ciertas patologías y provocará menor prevalencia de enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento con mayor calidad y esperanza de vida respecto al grupo control. Esto sería debido a la disminución en la liberación de citoquinas proinflamatorias y menor activación de la caspasa 1. A su vez, planteamos, cómo una dieta hipercalórica, provocará mayor estrés metabólico y producción de radicales libres, con una mayor actividad inflamatoria, empeorando el proceso de envejecimiento, siendo más acusado

en ratones wild type que en los que presenten la delección NLRP3 con una supuesta protección ante los procesos inflamatorios.

Este estudio ayudaría al entendimiento del envejecimiento, las patologías asociadas al mismo y el papel que pueda tener en éstas el complejo inflamasoma y la dieta. Pudiendo resultar en una nueva opción terapéutica para pacientes con enfermedades en las que la inflamación crónica dependiente del envejecimiento tiene un papel fundamental, como son patología cardiovascular, obesidad, alzheimer, demencias, artritis, cáncer y diabetes tipo 2.

Proponemos los animales modificados genéticamente NLRP3 inflamasoma para prevenir la aparición de daño cardiaco relacionado con la edad y las dietas altas en grasas, para estudiar el mecanismo por el cual podrían aumentar su longevidad mejorando la función cardiaca.

III. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es conocer cómo la nutrición en países desarrollados, caracterizada por dietas hipercalóricas ricas en grasas, tiene un papel importante en el desarrollo de patologías asociadas al envejecimiento, centrándonos en la patología cardiovascular. Así como, estudiar la inflamación como fenotipo asociado al envejecimiento y estas patologías, analizando el papel fundamental que juega el complejo NLRP3- inflamasoma.

A su vez, nos planteamos una serie de objetivos secundarios:

1. Evaluación de la longevidad en ratones Wild type y NLRP3 -/- sometidos a dietas estándar e hipercalórica.
2. Evaluación del efecto de las dietas durante el envejecimiento metabólico en la salud de ratones Wild type y NLRP3 -/-.
3. Caracterización de la respuesta del tejido cardiaco al envejecimiento en ratones Wild type y NLRP3 -/- sometidos a dietas estándar e hipercalórica.

IV. MATERIAL Y MÉTODO

Declaraciones éticas

Los estudios en animales se realizaron de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (2010/63 / UE) y las reglamentaciones españolas correspondientes para el uso de animales de laboratorio en experimentos crónicos (RD 53/2013 sobre el cuidado de animales de experimentación). Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de institucional local de cuidado de animales y cuenta con la aprobación del comité de ética de experimentación animal de la Universidad de Sevilla y la Junta de Andalucía.

Grupos de estudio

Se prepararon grupos de animales para estudiar, mediante experimentación y con diversas pruebas y mediciones de control, la calidad de vida y la longevidad de cada grupo, tratando de llegar a unas conclusiones. Unos grupos se dejaron envejecer para estudiar la longevidad y su evolución en cuanto a peso e ingesta. Otros grupos se utilizaron para realizar experimentos.

C57BL6/J es una cepa consanguínea común de ratón de laboratorio con pelaje marrón oscuro. Es una línea establecida en The Jackson Laboratory. Se considera el fondo genético más ampliamente utilizado para ratones genéticamente modificados y para su uso como modelos de enfermedades humanas, debido a la disponibilidad de cepas congénitas, fácil crianza y robustez de estos animales. Se reproducen bien, son de larga vida y tienen baja susceptibilidad a los tumores. Tienen alta susceptibilidad a la obesidad inducida por la dieta, la diabetes tipo 2 y la aterosclerosis. Este tipo de ratón fue la segunda especie de mamífero en tener publicado su genoma completo.

Para todos los experimentos se usaron ratones machos. Se mantuvieron ratones C57BL6/J wild type y ratones transgénicos no consanguíneos NLRP3 -/- (mismo fondo genético C57BL6/J).

Los 6 grupos de estudio fueron:

- 2 grupos con 12 semanas, uno WT y otro NLRP3 -/-, alimentados con dieta estándar.
- 2 grupos WT estudiados a las 80 semanas y dejados envejecer hasta el fin de su periodo vital, uno alimentado con dieta estándar y otro alimentado con dieta obesogénica.

- 2 grupos NLRP3 -/- estudiados a las 80 semanas y dejados envejecer hasta el fin de su periodo vital, uno alimentado con dieta estándar y otro con dieta obesogénica.

Se siguieron los siguientes regímenes dietéticos:

- i) Dieta regular o dieta estándar (SD) de Teklad Global 14%, dieta proteica de mantenimiento de roedores, Harlan Laboratories (proporción de carbohidratos: proteína: grasa de 48: 14: 4 % de kcal)
- ii) Una dieta obesogénica hipercalórica que consiste en Teklad Global modificado con manteca de cerdo para proporcionar el 45% de las calorías de la dieta procedentes de grasa.

Todos los grupos tuvieron acceso ad libitum a su dieta y agua durante todo el estudio.

La evolución del peso corporal y la ingesta de alimentos se controlaron semanalmente durante toda la vida del animal hasta su fallecimiento.

Los ratones se alojaron en condiciones libres de patógenos específicos, a 20-22°C, con 30-70 % de humedad relativa y con ciclos de oscuridad / luz de 12 horas (ciclo de luz de 8:00 a.m. a 8:00 p.m.).

Procedimientos y pruebas de estudio realizadas

Curvas de longevidad

Para analizar la esperanza de vida de cada grupo, los animales eran revisados diariamente para comprobar su estado de salud general. La mayor parte de los animales fallecidos eran encontrados sin vida en inspecciones diarias. En el caso de comprobar que algún animal tuviera un estado de salud comprometido, eran sacrificados, bien por presentar heridas severas por mordeduras, tumores evidentes o lesiones en la piel, o debido a un estado de salud en el que se considerase que en las siguientes 24-48 horas habría fallecido. Gracias al registro de la muerte de cada ratón, diseñamos una curva de longevidad de Kaplan-Meier y comparamos la esperanza de vida entre los 4 grupos distintos de ratones que dejamos envejecer, en función de su dieta y su genética.

Las curvas de supervivencia se representaron mediante el método de Kaplan-Meier y se utilizó la versión de software Prism 6.0c (GraphPad, San Diego, CA) para el análisis de los datos.

Análisis del peso corporal e ingesta

Semanalmente se pesó la cantidad de comida que era ingerida por cada grupo de ratones, así como su peso medio de forma periódica para valorar la diferencia entre los distintos grupos en cuanto al crecimiento del tejido adiposo.

Natación forzada

Los ratones se colocaron individualmente en un cilindro de vidrio transparente de 2 l (19 cm de altura) lleno a una profundidad de 13 cm con agua a 23 ° C, durante 15 min. A las 24 horas, los ratones se sometieron a una sesión de 6 min de natación en agua y un observador ciego al tratamiento los calificó fuera de línea, considerando los minutos dos a seis de la sesión. La inmovilidad se definió como el mínimo movimiento posible para mantenerse a flote.

Deterioro cognitivo

Para ello, realizamos la prueba de construcción de nidos. La prueba de construcción de nidos se realizó en una jaula con medidas 28x12x16 cm. A cada ratón se le asignó una jaula durante 24 h para acomodar un nido a través de la colocación de algodones. Antes del ciclo nocturno, dos secciones de algodón (4,4 cm por pila) se colocaron en la jaula. Para los resultados de la construcción de nidos se otorgaron puntuaciones 24 h más tarde utilizando las siguientes reglas específicas:

- 0: Los tejidos no fueron tocados en absoluto.
- 1: Los tejidos estaban dispersos en la jaula, pero sin ser rasgados.
- 2: Los tejidos se juntaron en una esquina sin ser rasgados.
- 3: Los tejidos se juntaron en una esquina y una pequeña parte fue rasgada, y no se había formado un nido.
- 4: La mayoría de los tejidos se rasgaron y se amontonaron en un rincón, y un nido evidente se había realizado.

Reactivos

Se adquirió un cóctel de inhibidores de proteasa para la homogeneización de proteínas (Cóctel Inhibidor de Proteasa Complete™) de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). El kit de sustrato Immun Star HRP se obtuvo de Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA).

El reactivo de Bradford para el ensayo de concentración de proteínas se adquirió de Bio-Rad (Madrid, España).

Los anticuerpos monoclonales específicos para Beclin-1 y p62 se adquirieron en Sigma-Aldrich (Saint Louis, EE.UU.). El anticuerpo monoclonal anti-GAPDH se adquirió de Calbiochem-Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, Reino Unido). EL anticuerpo anti-NLRP3 se adquirió en Adipogen (San Diego, EE. UU.), la caspasa-3 anti-activa, anti-SIRT-1 y anti-Parkin se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EE. UU.). Finalmente, anticuerpos anti-IL-1 β (p17), anti-OGG-1, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-MnSOD, anti-catalasa, anti-ATG12 y anti-MAP-LC3 se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology.

Extracción de tejidos

Durante el sacrificio de los animales se extrajeron muestras de corazón e hígado, tras perfundir con 25 ml de suero fisiológico. Además se obtuvieron muestras de sangre y suero sin perfundir para determinaciones bioquímicas.

Corazón, hígado y grasa abdominal eran pesados y fotografiados.

Los tejidos eran divididos en varias muestras según la finalidad de estudio:

- En formol para histología: Las muestras que se preparaban para estudio histológico eran de corazón e hígado.

- En eppendorf a -80°C para estudio proteico mediante Western Blot.

- En eppendorf con RNA later para estudio de PCR real time. La solución RNAlater es una solución acuosa estabilizadora que impregna la mayoría de los tejidos rápidamente para estabilizar y proteger el ARN en las muestras frescas para su posterior estudio mediante PCR real time.

Test de tolerancia a la glucosa oral

A los animales de estudio se les inyectó glucosa intraperitonealmente (2g/kg de peso corporal) después de ayuno nocturno de 16 horas. Los niveles de glucosa en la sangre de la cola se midieron usando un glucómetro (Breeze 2, Bayer Health Care, EE. UU.) en los intervalos de tiempo de 0, 15, 30, 60 y 120 minutos.

Niveles de IL-1 β y TNF- α (Biomarcadores séricos inflamatorios)

Se analizaron los niveles séricos de IL-1 β (GenWay, San Diego CA, EE.UU.) Y TNF- α (Biosource, Reino Unido y GenWay, San Diego, EE.UU.) Se analizaron por duplicado utilizando kits ELISA comerciales (R&D Systems, Minneapolis, USA).

El procedimiento consiste en pipetear en una placa multipocillos revestidos de un anticuerpo específico para IL-1 β o TNF- α , 100 μ l de suero de cada muestra, se deja incubar durante una hora a temperatura ambiente. Tras esta primera incubación, IL-1 β o TNF- α es capturado e inmovilizado sobre la placa, tras ello se realizan los lavados correspondientes y se procede a la incubación con un segundo anticuerpo durante otra hora. Después de la eliminación del exceso de este segundo anticuerpo, se añade la enzima estreptavidina-peroxidasa. Ésta se une al anticuerpo puesto en segundo lugar para completar el sándwich de cuatro miembros. Después de una incubación y del lavado para eliminar toda la enzima no unida, se añadió una solución de sustrato, que actúa sobre la enzima unida para producir color. Finalmente las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro (iMark microplate, Bio-Rad) a una longitud de onda de 450nm. La intensidad de este producto coloreado es directamente proporcional a la concentración de IL-1 β o TNF- α presente en las muestras.

Estudio metabólico

Leptina y adiponectina

Los niveles séricos de leptina y adiponectina se analizaron por duplicado utilizando kits ELISA comerciales (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU).

Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1)

Los niveles séricos de IGF-1 se analizaron por duplicado utilizando kits ELISA comerciales (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU).

Biomarcadores de suero

Los niveles séricos de glucosa, triglicéridos, colesterol, ácido úrico, albúmina, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, bilirubina, creatinina y creatina quinasa se analizaron usando kits comerciales (Randox Laboratories, Antrim, Reino Unido).

Análisis de proteínas mediante Western Blot, inmunoblot o electrotransferencia

El Western blot es una técnica analítica usada en biología celular y molecular para identificar proteínas específicas de extractos celulares y tejidos. Esta técnica requiere varias etapas:

Realizamos una preparación previa de las muestras con tampón de lisis, el cual contiene 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA, 5% Tween-20. En caso de tratarse de células se utiliza un pellet recogido, si son muestras de tejidos, se homogeniza la muestra previamente. Por ml de tampón de lisis se utiliza 10 μ L de PMSF y 10 μ L de CIP en su preparación.

A) Método Bradford para cuantificación de proteínas en la muestra

La concentración proteica de la muestra fue medida utilizando un reactivo de ensayo de proteínas (Bio-Rad, Madrid, España) según el método Bradford. En función de la carga proteica preparamos con agua y LB cada muestra para el western blot.

Para determinar la cantidad de proteínas para los ensayos de Western-Blot se usó una modificación del método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) ideada para muestras que contienen membranas (Stoschek, 1990). El ensayo se realizó añadiendo en una cubeta de espectrofotómetro 10 μ L de NaOH 1M, 1 μ L de la muestra y 200 μ L de reactivo de Bradford por cada pocillo, dejando uno sin muestra para control. Tras dejar incubar la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, se midió la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro UniCam UV 500 (Thermo Spectronic). La cantidad de proteína fue determinada mediante una recta patrón realizada con cantidades conocidas de inmunoglobulina G (0-28 μ g). Dejamos reposar la preparación toda la noche (overnight).

B) SDS-Page y Western-Blot

El análisis de las proteínas que estaban presentes en los lisados celulares se llevó a cabo mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), según el procedimiento descrito por Laemli (Laemli, 1970), a una intensidad de 35mM/gel en un sistema MiniProtean III (Bio-Rad) y con tampón de carrera TGS10X (Tris/Glycine/SDS Buffer 10X, BioRad). El análisis de inmunotransferencia se realizó con 20 μ g de

proteína total, se separó en geles de acrilamida SDS PAGE al 12% (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE. UU.)

Se prepararon geles de diferentes concentraciones de acrilamida de acuerdo a las necesidades del peso molecular de las proteínas a estudiar, gel separador, y al 4% el gel condensador. Cargamos las diferentes calles para colocar las muestras y un control de carga para verificar el proceso.

Realizamos la electroforesis a 120 V en tampón de electroforesis TGS (Tris/Glicina/SDS, Bio-Rad).

Tras la electroforesis se procedió a la **transferencia** a un soporte sólido (Trans-Blot, SD, Semi-Dry Transfer Cell con fuente de alimentación Bio-Rad Power Pac 1000) a 25V y durante 45 minutos en tampón de transferencia TG (Tris/Glycine Buffer 10X, BioRad). Se usaron membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm como soporte (Hybond-ECL, Amersham Biosciences). Finalizada la transferencia, para comprobar que la misma se ha realizado correctamente, la membrana de nitrocelulosa fue teñida con una solución de Rojo Ponceau al 0.5%. Después de desteñir el rojo Ponceau con ácido acético 1% se procede al lavado y bloqueo de la membrana para posterior marcación de la proteína de estudio.

C) Inmunodetección con anticuerpos y análisis de la membrana

Después de la electroforesis y transferencia de proteínas, las membranas se bloquearon en un tampón bloqueante de grado blotín (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE. UU.) durante 2 horas. Después del lavado, la inmunotransferencia se realizó a 4°C durante la noche con agitación usando anticuerpos primarios (1: 1000) contra Sirt1, AKT, pAKT, Beclin1, LC3, Parkin, Bcl2, BAX, Caspase-3, PPARα y GAPDH (Santa Cruz Biotecnología, EE. UU.), AMPK, p-AMPK, PI3K, p-PI3K, mTOR, p-mTOR, SQSTM1 / p62 (Cell Signaling, USA). Después de enjuagar, las membranas se incubaron en una dilución 1: 10000 con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante (HPR) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se adquirió IgG goat anti-rabbit, anti-mouse y rabbit anti-goat de Calbiochem-Merck Ltd (Nottingham, Reino Unido). Para demostrar que las cargas eran iguales en las transferencias, se analizó la expresión de GAPDH con un anticuerpo anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) además de con el método Ponceau S descrito

previamente. Los complejos de proteínas específicas se identificaron utilizando el kit de sustrato Immun Star HRP (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE. UU).

Finalmente se detecta y visualiza la unión antígeno-anticuerpo por quimioluminiscencia habiendo colocado luminol en la membrana durante 5 minutos y revelando con el escáner de detección. En la imagen obtenida podremos estudiar las bandas que nos muestran las proteínas específicas de la muestra. La inmunodetección se realizó con el kit de detección de luz quimioluminiscente WesternSure (LI-COR Biosciencias, EE.UU). Las señales de detección inmunológica se capturaron utilizando el escáner de transferencia C-Digit y el software de estudio de imágenes Digits (LI-COR Biosciencias, EE. UU.) Los datos densitométricos se registraron después de la normalización del control de carga. Las señales se analizaron y cuantificaron mediante un sistema de análisis y procesamiento de imágenes en Java (Software Image J, Softonic).

Histología

Tras la anestesia de los ratones, se extrajeron y cortaron los corazones e hígados, colocándose inmediatamente en una formalina tamponada neutra al 10% a temperatura ambiente durante 24 horas después de un breve enjuague con PBS. Las muestras se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 5 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las áreas de sección transversal de cardiomiocitos se calcularon en un microscopio digital ($\times 400$) con el software ImageJ (versión 1.49).

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como medias \pm SEM. Después de la evaluación de la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk, se midieron las diferencias estadísticas entre los diferentes grupos utilizando un análisis de varianza de 1 vía (ANOVA) cuando fue apropiado con la prueba de Tukey post hoc. Un valor de P de ≤ 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prism versión 5.0a (GraphPad, San Diego, CA). Los asteriscos en las figuras representan lo siguiente: *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; y ***: $P \leq 0.001$.

V. RESULTADOS

Dieta obesogénica y ausencia de NLRP3 inflammasoma modifican el proceso de envejecimiento con cambios en la longevidad y el comportamiento.

En base a la bibliografía analizada en la introducción, determinamos, mediante el análisis de los diferentes grupos, cómo afectan la variable de una dieta alta en grasas y la inhibición genética del complejo NLRP3 inflammasoma durante el proceso de envejecimiento en los diferentes grupos de estudio.

Al analizar la longevidad de cada grupo de estudio, se observa un aumento en la vida media de los ratones NLRP3 $-/-$ [Figura 1A] respecto al grupo WT con dieta estándar. A su vez, también podemos apreciar una mayor vida media en ratones NLRP3 $-/-$ respecto a los WT en los grupos alimentados con una dieta obesogénica.

La ingesta diaria y el peso corporal de cada grupo fue monitorizado semanalmente durante toda la duración del estudio [Figura 1B, Figura 1C] observándose una mayor ingesta en los grupos con dieta obesogénica, mantenida en la última etapa de la vida en el grupo WT y reduciéndose en el grupo NLRP3 $-/-$ hacia una ingesta más similar a los grupos alimentados con dieta estándar. Respecto al peso corporal [Figura 1B], se observa, como es de esperar, un aumento durante la etapa media de la vida en los grupos alimentados con dieta obesogénica, siendo este aumento más acentuado en los ratones WT que en los NLRP3 $-/-$ por lo que parece existir una cierta protección frente a la ganancia de peso y desarrollo de obesidad en dietas hipercalóricas ante la delección.

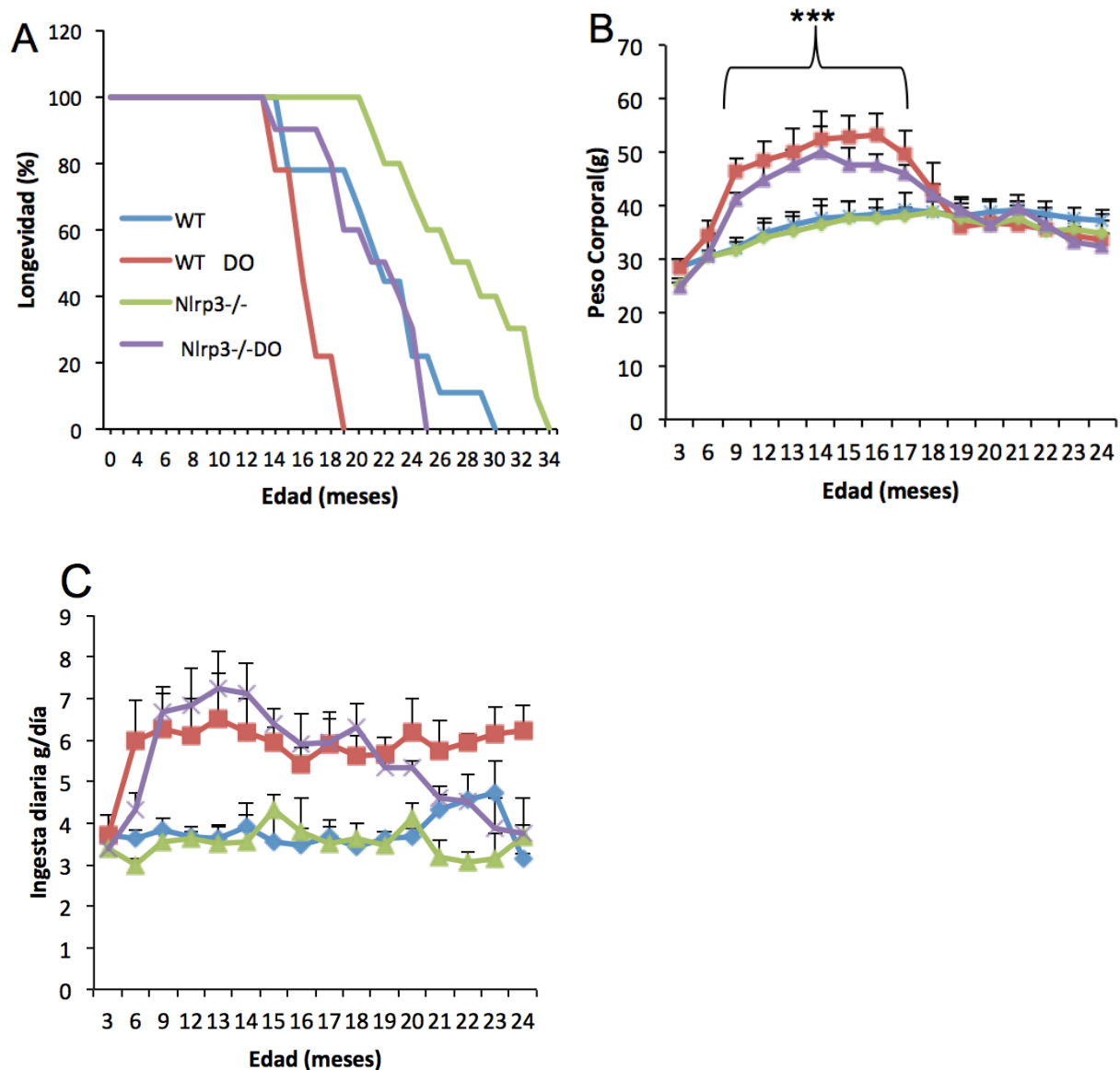


Figura 1. Dieta obesogénica e inhibición de NLRP3 modifican supervivencia y peso corporal. (A) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para ratones wild type y NLRP3 ^{-/-} con dietas estándar y obesogénica, (B) Pesos corporales de cada grupo durante 24 meses, (C) Ingesta diaria.

Los valores se expresan como medias \pm SEM. n=10. ***P < 0.001 ratones WT con dieta obesogénica vs ratones NLRP3 ^{-/-} con dieta obesogénica.

Respecto a la apariencia externa, se puede observar cómo los ratones alimentados con una dieta alta en grasas y con mayor peso corporal, tienen un mayor volumen abdominal, más apreciable en el grupo WT que en el grupo NLRP3 ^{-/-} que presenta un aumento de peso más controlado [Figura 2A]. También se aprecia mayor problema de alopecia y peor aspecto del pelaje en el grupo WT respecto a los ratones

NLRP3 $-/-$ en ratones adultos con dietas obesogénicas. Una de las características inflamatorias observadas en el grupo WT alimentado con dieta obesogénica y no observado en el grupo NLRP3 $-/-$ fue la dermatitis ulcerosa. No se conoce la etiología de este problema inflamatorio de la piel pero se asocia al envejecimiento acompañado con una dieta alta en grasas [168].

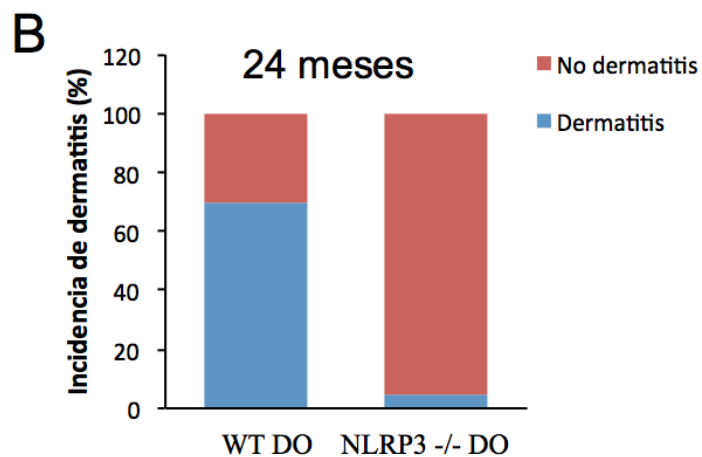
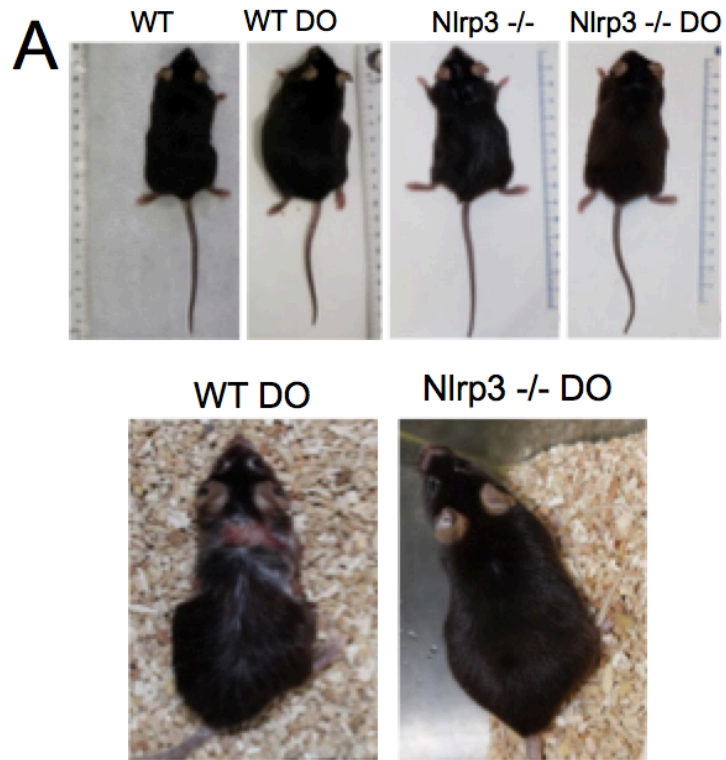


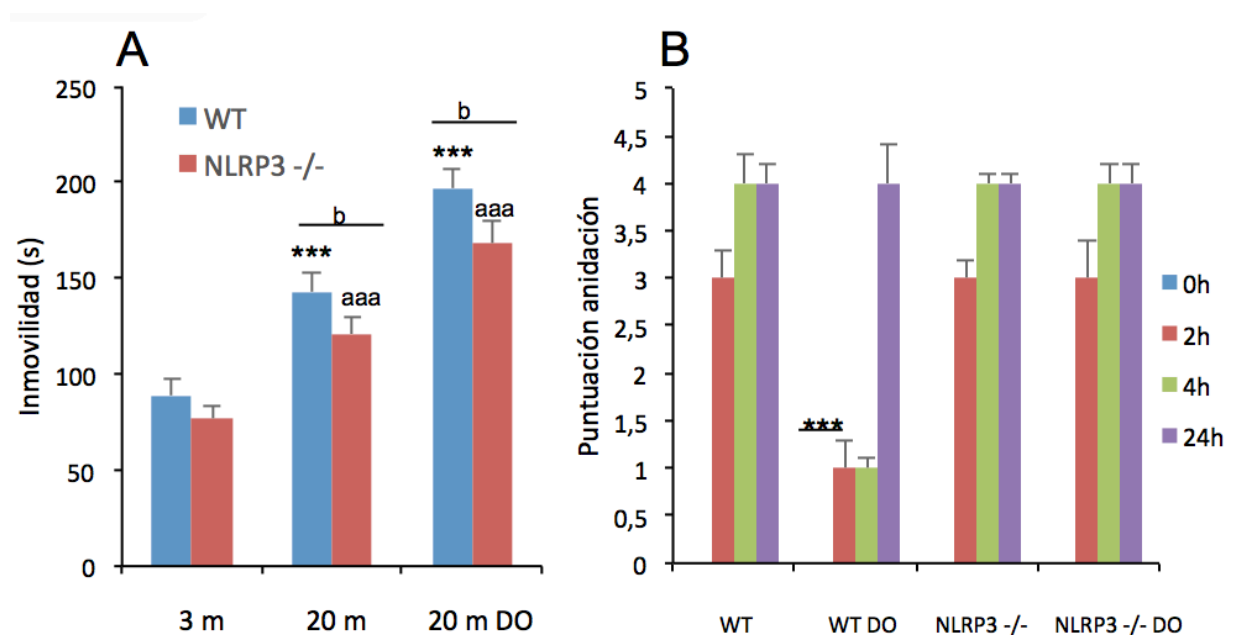
Figura 2. Apariencia externa de cada grupo e incidencia de dermatitis ulcerosa. (A) Aspecto de los diferentes grupos de estudio envejecidos con dietas estándar y obesogénica e incidencia de dermatitis ulcerosa en ratones adultos de cada grupo con dieta obesogénica. **(B)** Diagrama de valoración de la dermatitis ulcerosa.

Para el estudio del comportamiento y la salud mental, cuyo deterioro se asocia al envejecimiento y la obesidad [33], se valoró el deterioro cognitivo mediante la prueba de anidación a los 20 meses de cada uno de los 4 grupos adultos, así como la inmovilidad mediante la prueba de natación forzada de dichos grupos respecto a los ratones jóvenes para valorar la capacidad motora [Figura 3].

El sistema nervioso, al igual que el corazón, es un tejido postmitótico, por lo que mediante su estudio, valoramos su estado en los diferentes grupos para apoyar los resultados a nivel del sistema nervioso central.

En la prueba de natación forzada, los ratones envejecidos, presentan mayor tiempo de inmovilidad respecto a los ratones jóvenes de ambos grupos, mostrando un mayor nivel de depresión. Así mismo, los grupos envejecidos con dieta obesogénica demuestran una mayor afectación motora con mayor tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada, siendo más acusada en el grupo WT que en NLRP3 -/- [Figura 3A], prueba de que la dieta hipercalórica y la deleción modifican el comportamiento y el deterioro a nivel del sistema nervioso.

En la prueba de anidación, para valorar el deterioro cognitivo de cada grupo de estudio, apreciamos un mayor tiempo necesario para la formación del nido en el grupo wild type con dieta obesogénica en comparación con los otros 3 grupos, lo que refleja un deterioro cognitivo mayor en los ratones que conforman dicho grupo [Figura 3B].



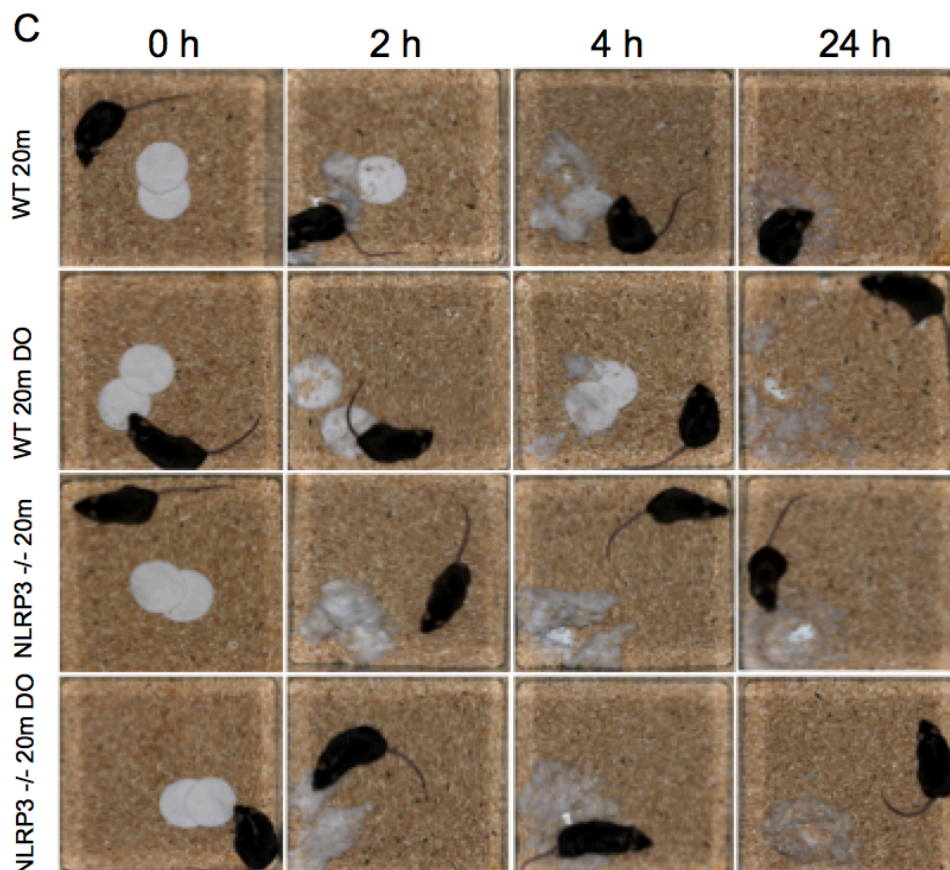


Figura 3. Inmovilidad y puntuación de anidación donde WT DO obtiene los peores valores. (A) Tiempo de inmovilidad durante la prueba de natación forzada, (B) Puntuación de anidación, (C) Aspecto del nido en cada grupo.

Los valores se expresan como medias \pm SEM de experimentos independientes por triplicado. $n = 10$. *** $P < 0.001$ ratones jóvenes vs ratones adultos y con dieta obesogénica WT. ^{aaa} $P < 0.001$ ratones jóvenes vs ratones adultos y con dieta obesogénica NLRP3 $-/-$. ^b $P < 0.05$ ratones WT vs ratones NLRP3 $-/-$.

Dieta obesogénica y ausencia de NLRP3 inflammasoma modifican el metabolismo.

El proceso de envejecimiento y una dieta alta en grasas ha sido relacionado con la aparición de desórdenes metabólicos como la resistencia a la insulina y aparición de diabetes [36], habiéndose relacionado al complejo NLRP3 con un papel primordial en la aparición de estos desórdenes [193]. Es por ello que estudiamos también el efecto de la dieta hipercalórica continuada y el efecto de la inhibición genética del complejo inflammasoma NLRP3 en la glucemia tras ayuno nocturno. Los ratones de 20 meses WT alimentados con dieta obesogénica mostraron cambios en el metabolismo de la glucosa

respecto a los WT de 20 meses alimentados con dieta estándar. El análisis de los valores de glucosa en sangre tras el test de tolerancia a la glucosa obtuvo los valores más elevados en ratones WT adultos con dieta obesogénica [Figura 4A]. Los ratones NLRP3 $-/-$ de 20 meses estudiados, respondieron al metabolismo de la glucosa de forma similar entre el grupo con dieta estándar y el de dieta obesogénica, con tolerancia y buen metabolismo de la glucosa a lo largo del tiempo y valores similares al grupo WT alimentado con dieta estándar [Figura 4B]. Esto también fue observado por el aumento del área bajo la curva (AUC) en el grupo WT 20 dieta obesogénica respecto a WT alimentado con dieta estándar y a los grupos NLRP3 $-/-$.

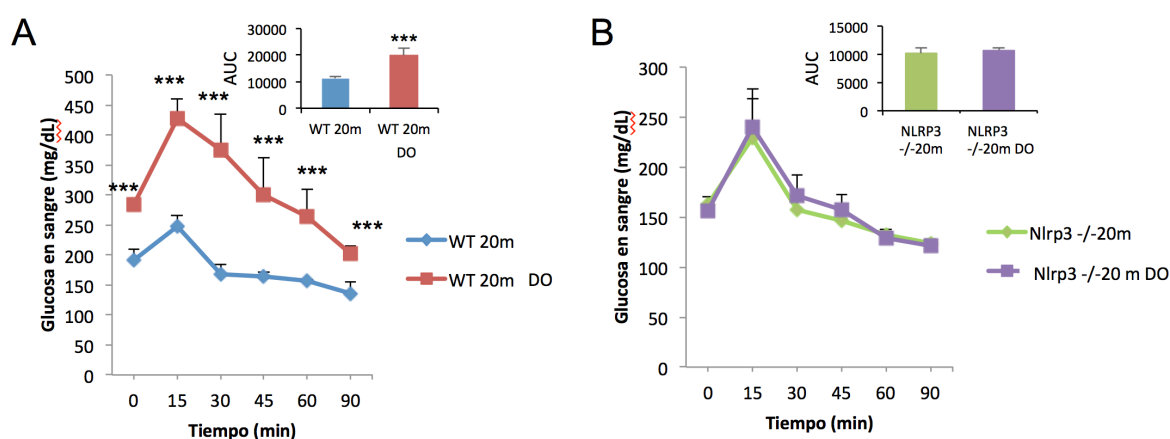


Figura 4. Inhibición genética de NLRP3 y dieta obesogénica alteran el metabolismo de la glucosa. (A) Test de tolerancia oral a la glucosa con niveles séricos de glucosa analizados en los tiempos indicados y el área total bajo la curva (AUC) para ratones adultos WT con dietas estándar y obesogénica, (B) Test de tolerancia oral a la glucosa con niveles séricos de glucosa en los tiempos indicados y el área total bajo la curva (AUC) para ratones adultos NLRP3 $-/-$ con dietas estándar y obesogénica. A los ratones se les administró glucosa vía oral a 2g/kg después de un ayuno nocturno.

Los valores se expresan como medias \pm SEM de experimentos independientes por triplicado. n=8. ***P <0.001 ratones WT adultos vs ratones WT adultos y con dieta obesogénica.

El factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) es una proteína, similar en estructura a la molécula de la insulina, potente inhibidor de la autofagia. Un aumento de IGF-1 se relaciona con disminución de la resistencia al estrés y disfunción metabólica. Sin embargo, su reducción ha demostrado prevenir el envejecimiento celular y el inicio de patologías [77]. Los valores de IGF-1 en suero disminuyeron en ratones NLRP3 $-/-$ [Figura 5] tanto en ratones jóvenes y envejecidos con dieta estándar y en el grupo envejecido con dieta obesogénica, teniendo un descenso más acusado en este último.

Estos niveles séricos disminuidos de IGF-1 estables y mantenidos a lo largo del tiempo pueden ser los responsables del aumento de la vida útil que mostraron los ratones NLRP3 $-/-$ durante el estudio [Figura 1A] ya que se relaciona con resistencia al estrés y efecto antienviejimiento [78, 79, 80].

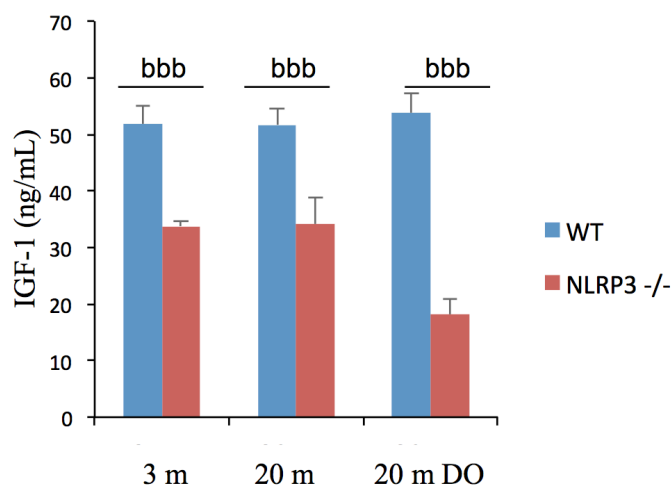


Figura 5. Inhibición genética de NLRP3 y dieta obesogénica alteran valores de IGF-1. Niveles séricos del factor de crecimiento insulínico tipo 1 en ratones jóvenes y adultos alimentados ad libitum con dietas estándar y obesogénica.

Los valores se expresan como medias \pm SEM de experimentos independientes por triplicado. $n=8$. ^{bbb} $P < 0.001$ ratones WT vs ratones NLRP3 $-/-$.

La leptina y la adiponectina son reguladores del metabolismo energético del organismo. La leptina es un regulador del peso corporal y la disregulación del ratio leptina/adiponectina ha sido asociado con síndrome metabólico, hígado graso no alcohólico y problemas cardiovasculares [26]. Es por ello que estudiamos los niveles séricos de las hormonas metabólicas leptina y adiponectina en cada uno de los grupos de estudio. La leptina mostró niveles séricos similares en WT y NLRP3 $-/-$ en ratones jóvenes y niveles más elevados durante el envejecimiento, observándose los mayores niveles en ratones envejecidos wild type con dieta obesogénica, siendo los niveles en ratones envejecidos NLRP3 $-/-$ más reducidos, sin diferencias significativas entre dieta estándar y obesogénica en este caso [Figura 6A].

La adiponectina disminuyó en ratones WT envejecidos con dieta estándar respecto a los ratones jóvenes del mismo grupo. Sin embargo aumentó en NLRP3 $-/-$ en ratones envejecidos con dieta estándar respecto a los jóvenes, con una diferencia significativa respecto a WT. En relación a los grupos envejecidos con dieta obesogénica, la

adiponectina circulante aumenta en ratones NLRP3 $-/-$ y WT respecto a los grupos jóvenes [Figura 6B]. Estos valores obtenidos nos marcan un ratio favorable, más reducido, Leptina/Adiponectina en ratones NLRP3 $-/-$ [Figura 6C] lo cual demuestra mayor sensibilidad a la insulina, oxidación de grasas y prevención de la obesidad, con protección ante enfermedades metabólicas.

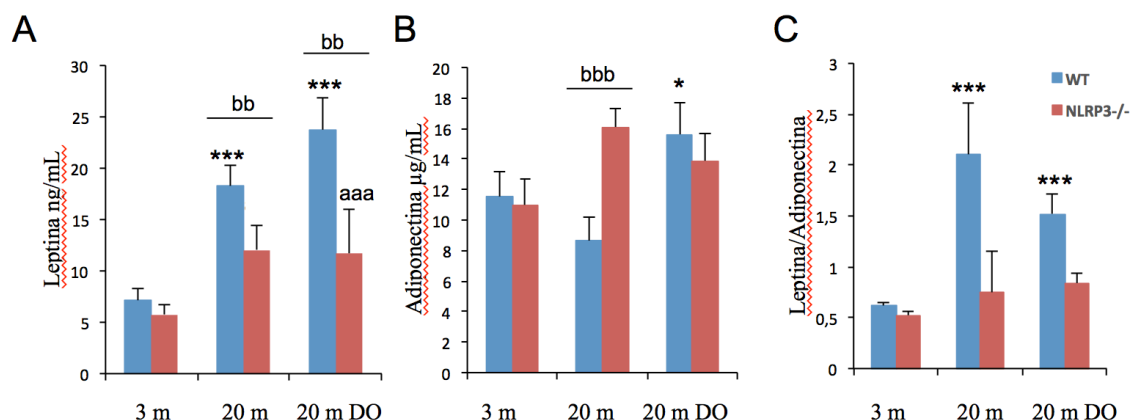


Figura 6. Inhibición de NLRP3 previene aparición de enfermedades metabólicas analizando las hormonas metabólicas leptina y adiponectina. (A) Valores en plasma de leptina en ratones jóvenes y adultos con dieta estándar y obesogénica, (B) Valores de adiponectina en ratones jóvenes y adultos con dieta estándar y obesogénica, (C) Relación leptina/adiponectina en los diferentes grupos de estudio.

Los valores se expresan como medias \pm SEM de experimentos independientes por triplicado. $n=8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$ ratones jóvenes vs ratones adultos y con dieta obesogénica WT. ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.005$, ^{aaa} $P < 0.001$ ratones jóvenes vs adultos y dieta obesogénica NLRP3 $-/-$. ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.005$, ^{bbb} $P < 0.001$ ratones WT vs NLRP3 $-/-$.

El complejo NLRP3 inflammasoma se ha relacionado con un papel primario a la hora del avance de desarrollo de desórdenes metabólicos [192]. La inhibición genética del complejo NLRP3 inflammasoma parece prevenir el desarrollo de los mismos durante el envejecimiento en ratones alimentados tanto con dieta estándar como con dieta alta en grasas. Se analizaron biomarcadores séricos en cada uno de los 6 grupos de estudio, detallados en la tabla de bioquímica sérica [Tabla 1].

Se aprecian niveles de colesterol en plasma más reducidos en el grupo adulto NLRP3 $-/-$ alimentado con dieta alta en grasas comparado con el grupo WT con la misma dieta. Los valores séricos de glucosa también están reducidos en NLRP3 $-/-$ envejecido con

dieta obesogénica mostrando mejor tolerancia al metabolismo de la glucosa. Este grupo también presenta reducción de transaminasas hepáticas, creatina fosfoquinasa, ácido úrico y creatinina. Siendo todos ellos marcadores de envejecimiento celular y reflejando menor avance del proceso en ratones NLRP3 -/-.

Tabla 1. Parámetros bioquímicos en plasma de ratones NLRP3 -/- y wild-type durante el envejecimiento con dieta estándar y dieta obesogénica.

Parámetros	WT			NLRP3 -/-		
	3m	20m	DO	3m	20m	DO
Colesterol (mg/dL)	307.6 (11.2)	364.1 (9.5)**	401.9 (12.4)***	305.8 (12.4)	316.3 (15.2) ^a	333.8 (14.5) ^{aa}
Triglicéridos (mg/dL)	34.3 (5.7)	27.2 (6.3)	32.1 (5.8)	32.5 (7.2)	24.3 (12.1)	33.7 (10.5)
Glucosa (mg/dL)	131.7 (4.2)	279.9 (9.8)***	286.3 (5.9)***	149.8 (6.8)	110.2 (10.1) ^{aaa}	136.5 (15.2) ^{aaa}
Albúmina (mg/dL)	2.95 (0.14)	2.39 (0.25)	3.08 (0.18)	3.19 (0.10)	1.95 (0.09)	2.30 (0.13)
Bilirubina (mg/dL)	0.15 (0.02)	0.16 (0.03)	0.17 (0.04)	0.14 (0.02)	0.15 (0.03)	0.16 (0.04)
Ala aminotransferasa (UL)	318.6 (78)	459.3 (86)***	541.1 (76)***	328.1 (99)	362.8 (82) ^{aaa}	371.5 (97) ^{aaa}
Asp aminotransferasa (UL)	321.6 (83)	482.6 (72)***	528.9 (80)***	345.2 (97)	370.5 (85) ^{aaa}	389.1 (79)
Creatina fosfoquinasa (UL)	3759 (911)	5015 (762)***	6121 (810)***	3567 (815)	3697 (599) ^{aaa}	3932 (734) ^{aaa}

Ácido úrico ($\mu\text{Mol/dL}$)	24.31 (2.5)	32.15 (1.7)**	29.39 (1.6)*	29.15 (1.8) ^a	24.31 (1.5) ^{aaa}	30.99 (1.6)
Creatinina (mg/dL)	0.78 (0.02)	1.37 (0.22)**	1.17 (0.12)*	0.91 (0.13)	1.01 (0.09)	1.04 (0.07)

Los valores se presentan como media \pm SEM. n=10. UL, unidades por litro. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 ratones jóvenes vs ratones adultos y con dieta obesogénica WT. ^aP<0.05, ^{aa}P < 0.005, ^{aaa}P<0.001 ratones jóvenes vs adultos y dieta obesogénica NLRP3 -/-.

Un aumento en los niveles séricos de TNF- α ha sido relacionado con el envejecimiento y patologías cardíacas, siendo un importante indicador de inflamación con alto valor clínico [121, 165]. Se realizó el análisis de este biomarcador sérico mediante el test ELISA. Sus valores se vieron elevados considerablemente en los ratones WT adultos, sobre todo ante dieta obesogénica, respecto a los NLRP3 -/- [Figura 7] reflejando una mayor estado inflamatorio en estos grupos no transgénicos.

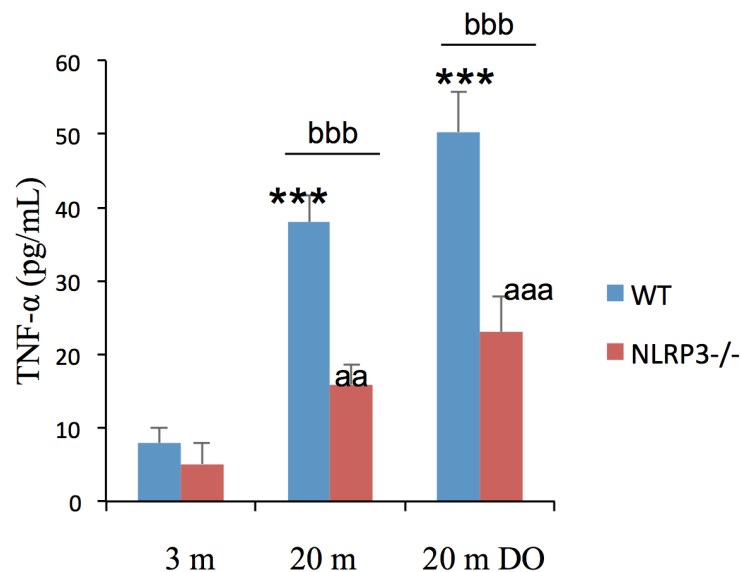
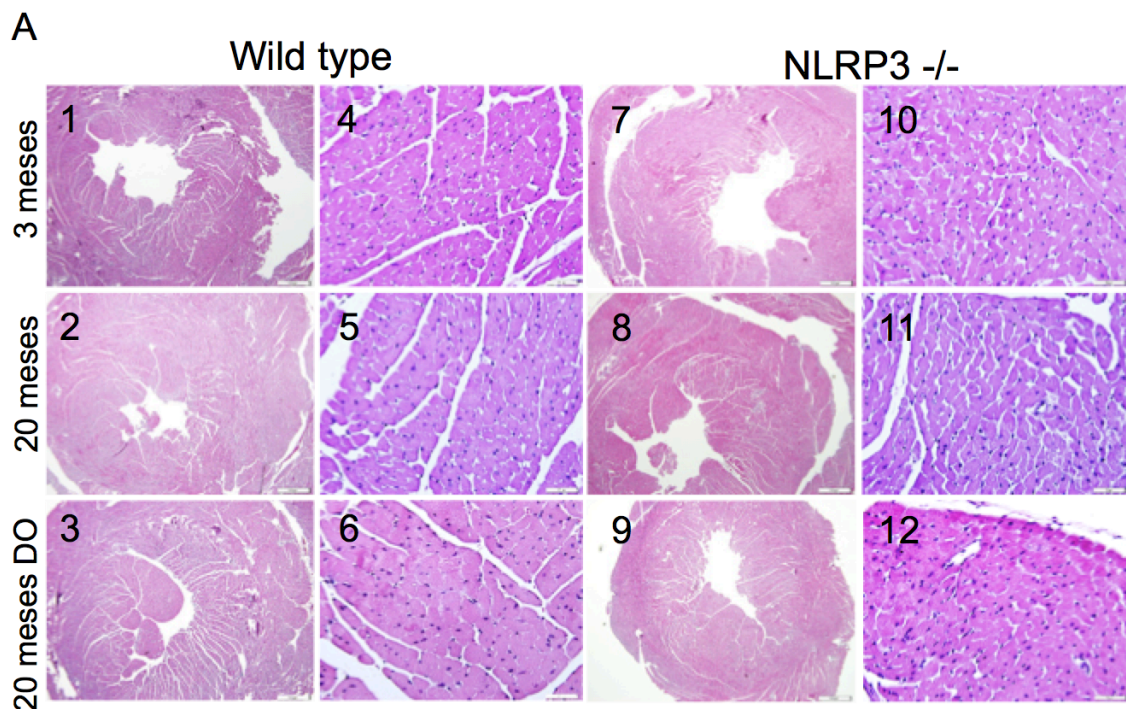


Figura 7. NLRP3 -/- muestra menor expresión de biomarcador sérico inflamatorio TNF- α en ratones adultos y ante dieta obesogénica.

Los valores se expresan como medias \pm SEM de experimentos independientes por triplicado. n = 8. * P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.001 ratones jóvenes vs ratones adultos y con dieta obesogénica WT. ^aP < 0.05, ^{aa}P < 0.005, ^{aaa}P < 0.001 ratones jóvenes vs adultos y dieta obesogénica NLRP3 -/-. ^bP < 0.05, ^{bb}P < 0.005, ^{bbb}P < 0.001 ratones WT vs NLRP3 -/-.

La ausencia de NLRP3 inflammasoma retrasa el envejecimiento cardiaco con efectos cardioprotectores tanto con una dieta estándar como ante una dieta obesogénica.

La hipertrofia cardiaca es una de las características fisiopatológicas asociadas al envejecimiento y daño cardiaco [152]. Para evaluar el impacto de la dieta hipercalórica y la ausencia de NLRP3 sobre la morfología del miocardio se examinó mediante microscopía el área de la sección transversal de los cardiomiocitos en tinciones con hematoxilina-eosina [Figura 8A] donde se reveló un área de los cardiomiocitos aumentada en los ratones wild type envejecidos, en mayor medida en los alimentados con dieta obesogénica [Figura 8B]. Al analizar el tejido cardiaco se observa también hipertrofia del ventrículo izquierdo y aumento de masa miocárdica acentuado en los ratones envejecidos wild type con dieta obesogénica, muestra de un mayor envejecimiento y daño que en los ratones NLRP3 $-/-$ que presentaban menor aumento de volumen y peso cardiaco [Figura 8C].



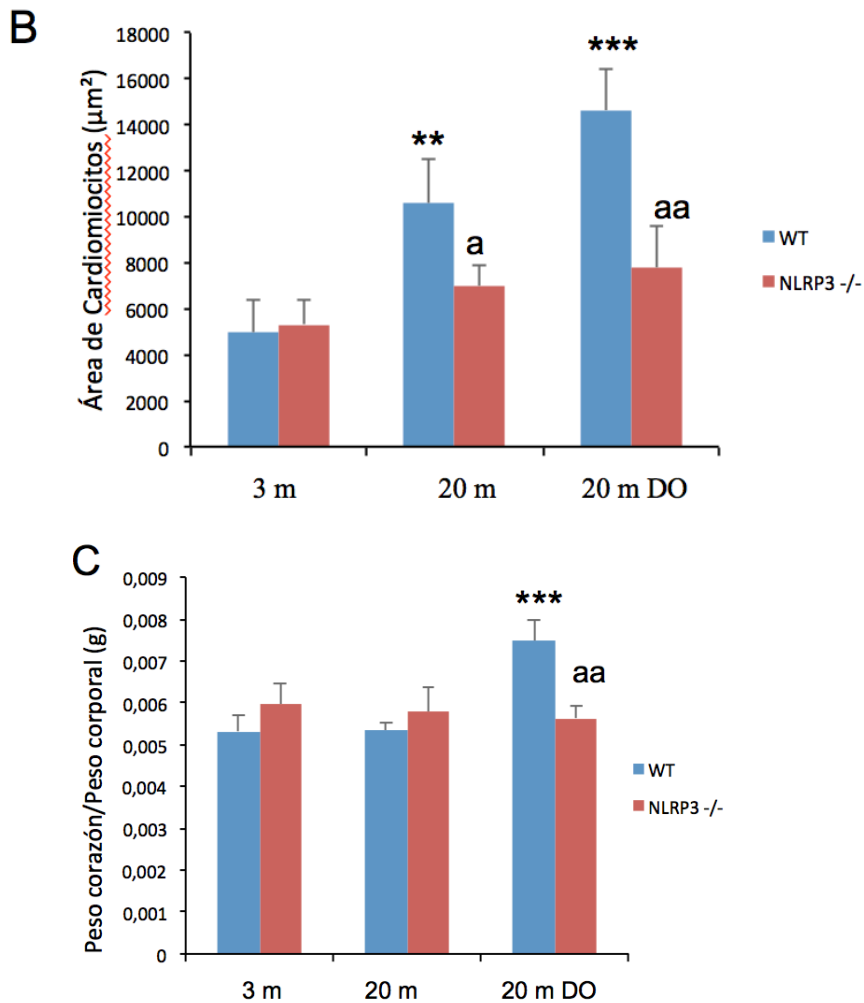


Figura 8. NLRP3 inflammasoma y dieta obesogénica intervienen en la morfología y función cardíaca. (A) Micrografías representativas teñidas con hematoxilina-eosina (400x) que muestran el área de la sección transversal y secciones perivasculares de los diferentes grupos (B) Análisis cuantitativo del área de la sección transversal de los cardiomiocitos con mediciones de aproximadamente 100 cardiomiocitos por grupo. (C) Peso cardíaco normalizado de cada grupo de estudio.

Los valores se expresan como medias \pm SEM de experimentos independientes por triplicado (n = 4-5 ratones para todos los grupos).

* P <0.05, ** P <0.005, *** P <0.001 ratones jóvenes vs adultos y dieta obesogénica WT. ^aP <0.05, ^{aa}P <0.005, ^{aaa}P <0.001 ratones jóvenes vs adultos y dieta obesogénica NLRP3 -/-.

La inhibición de NLRP3 inflamasoma induce a Sirt 1, mejora el flujo autofágico, reduce apoptosis y ruta mTOR protegiendo frente al envejecimiento cardiaco ante una dieta estándar y obesogénica.

La autofagia confiere un mecanismo de protección frente al acúmulo de desechos y la disfunción celular para conseguir mantener la homeostasis celular. Ante situaciones de estrés, como es el proceso de envejecimiento o una dieta alta en grasas, la autofagia ayudaría a responder como mecanismo de protección celular para la supervivencia. Durante el proceso de envejecimiento la autofagia se vuelve menos eficaz y disminuye, favoreciendo la disfunción celular y el daño cardiaco [153].

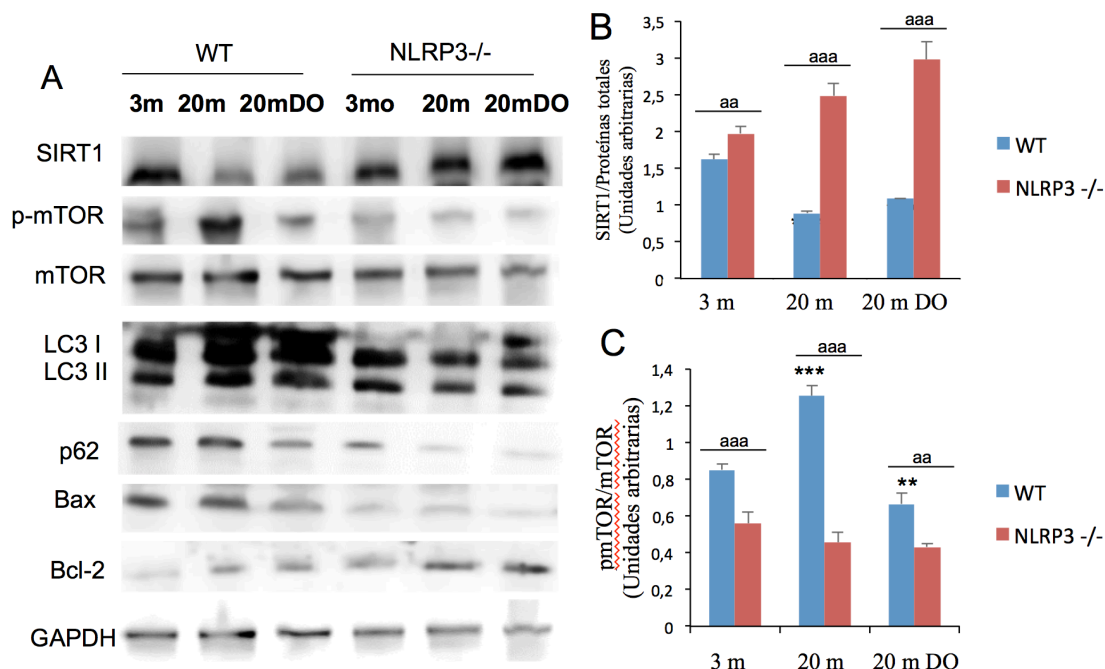
Mediante western blot realizamos un estudio proteico y valoramos la autofagia de los diferentes grupos de estudio obteniendo mejores resultados en grupos NLRP3 $-/-$. La proteína SIRT1 tiene un papel fundamental en la mejora del metabolismo y protección cardiaca durante el envejecimiento mediante la inducción autofágica y la inhibición de mTOR [207]. Los ratones NLRP3 $-/-$ presentaron incrementados niveles de SIRT1 tanto en dieta estándar como obesogénica en comparación con los ratones WT, en cuyo caso se observó un descenso de esta proteína. Esto demuestra un efecto antioxidante y antiinflamatorio con un papel cardioprotector y antienvjecimiento atribuido a SIRT1 [83, 86] [Figura 9A y 9B].

La vía mTOR desempeña funciones reguladoras cruciales en la fisiología y patología cardiovascular, su ausencia es incompatible con la vida pero su atenuación se relaciona a una mayor autofagia, previniendo el daño celular cardiaco relacionado a la edad y al estrés por dietas altas en grasas, conllevando un envejecimiento más saludable [94, 98, 136]. Observamos una atenuación de la ruta mTOR en los grupos NLRP3 $-/-$ [Figura 9A y 9C] lo que implica una reactivación de la autofagia y contribución a mejor respuesta cardiaca durante el proceso de envejecimiento por mantenimiento de la homeostasis celular.

La disfunción autofágica ha sido ligada al envejecimiento y obesidad mediante un bloqueo del flujo autofágico y acumulación de autofagosomas sin degradar [113]. LC3 II y p62 son dos proteínas implicadas en el proceso de formación de autofagosomas y en la vía de eliminación autofágica [130, 131]. La sobreexpresión de LC3 II observada [Figura 9A y 9D] puede ser debida a un aumento de la autofagia o al deterioro del flujo autofágico, por lo que sus cambios han de interpretarse junto con los niveles de p62. El

grupo NLRP3 $-/-$ presentó valores correspondientes a una maquinaria autofágica mantenida y más eficiente, mostrando niveles de p62 más reducidos. Los ratones WT presentaban niveles más altos de p62 que los ratones NLRP3 $-/-$ [Figura 9A y 9E], más acusados en dieta estándar, correspondiéndose con un proceso autofágico deteriorado en ratones WT.

Las dietas hipercalóricas y el envejecimiento se asocian al estrés oxidativo, disregulación de la inflamación y la apoptosis de los cardiomiocitos [164]. Es por ello que se analizaron los principales biomarcadores apoptóticos, viéndose un incremento durante el envejecimiento del biomarcador apoptótico BAX, con reducción en las dietas obesogénicas. En el caso de los ratones NLRP3 $-/-$ no se observó un daño acusado de esta vía apoptótica probablemente por un mejor flujo autofágico. Los niveles de BAX cardiaco, proteína pro-apoptótica, presentaba valores elevados en ratones WT respecto a NLRP3 $-/-$ [Figura 9A y 9F]. Sin embargo, Bcl-2, proteína antiapoptótica, mostró niveles aumentados en el grupo NLRP3 $-/-$ previniendo la apoptosis de los cardiomiocitos [Figura 9A y 9G]. Analizando el ratio BAX/Bcl-2 se observa una gran diferencia apoptótica entre los ratones WT y NLRP3 $-/-$ [Figura 9H], mostrando una mayor apoptosis en ratones WT.



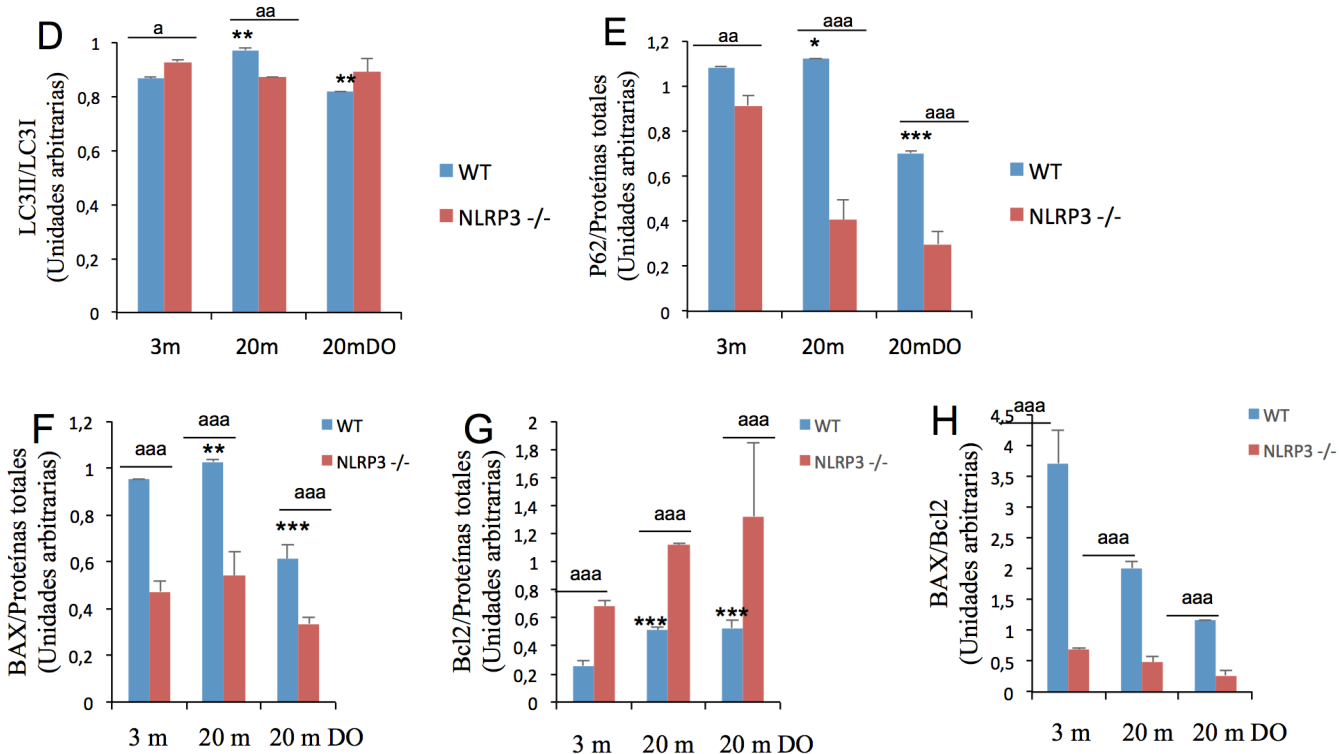


Figura 9. Deleción de NLRP3 y dieta obesogénica modifican el nivel y flujo autofágico, apoptosis, SIRT-1 y niveles mTOR en el tejido cardiaco. (A) Imágenes representativas de western blot de SIRT 1, p-mTOR, mTOR, LC3I, LC3II, p62, Bax, Bcl-2, GADPH. (B) Cuantificación de proteína SIRT1 frente a proteínas totales. (C) Cuantificación de proteína fosforilada mTOR frente a mTOR. (D) Cuantificación de proteína LC3 II frente a proteína LC3 I. (E) Cuantificación de proteína p62. (F) Cuantificación de proteína BAX. (G) Cuantificación de proteína Bcl2. (H) Cuantificación de proteína BAX frente a proteína Bcl2.

El análisis densitométrico se presenta como medias \pm SEM. $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$ ratones jóvenes vs adultos. ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.005$, ^{aaa} $P < 0.001$ ratones WT vs NLRP3^{-/-}

La inhibición de NLRP3 previene daño y disfunción hepática durante el envejecimiento y ante dietas obesogénicas.

El desarrollo de hígado graso no alcohólico es una patología común caracterizada por acumulación de lípidos en la estructura hepática ante dietas grasas, sedentarismo, desórdenes metabólicos, etc... En presencia de estrés oxidativo e inflamación crónica puede evolucionar a esteatohepatitis no alcohólica con riesgo de cirrosis y cáncer hepático [26].

Observamos un menor daño hepático en el grupo de estudio NLRP3^{-/-} envejecido con dietas estándar y dietas obesogénicas en comparación con los hígados de los ratones WT donde se puede apreciar mayor daño, más acusado en los alimentados con dieta

obesogénica, con un hígado con coloración pálida. En el estudio histológico se observa incremento de lípidos y esteatosis significativa en el grupo wild type adulto, siendo acusado en la dieta obesogénica, en comparación con el grupo NLRP3 $-/-$ con coloración e histología aparentemente normal.

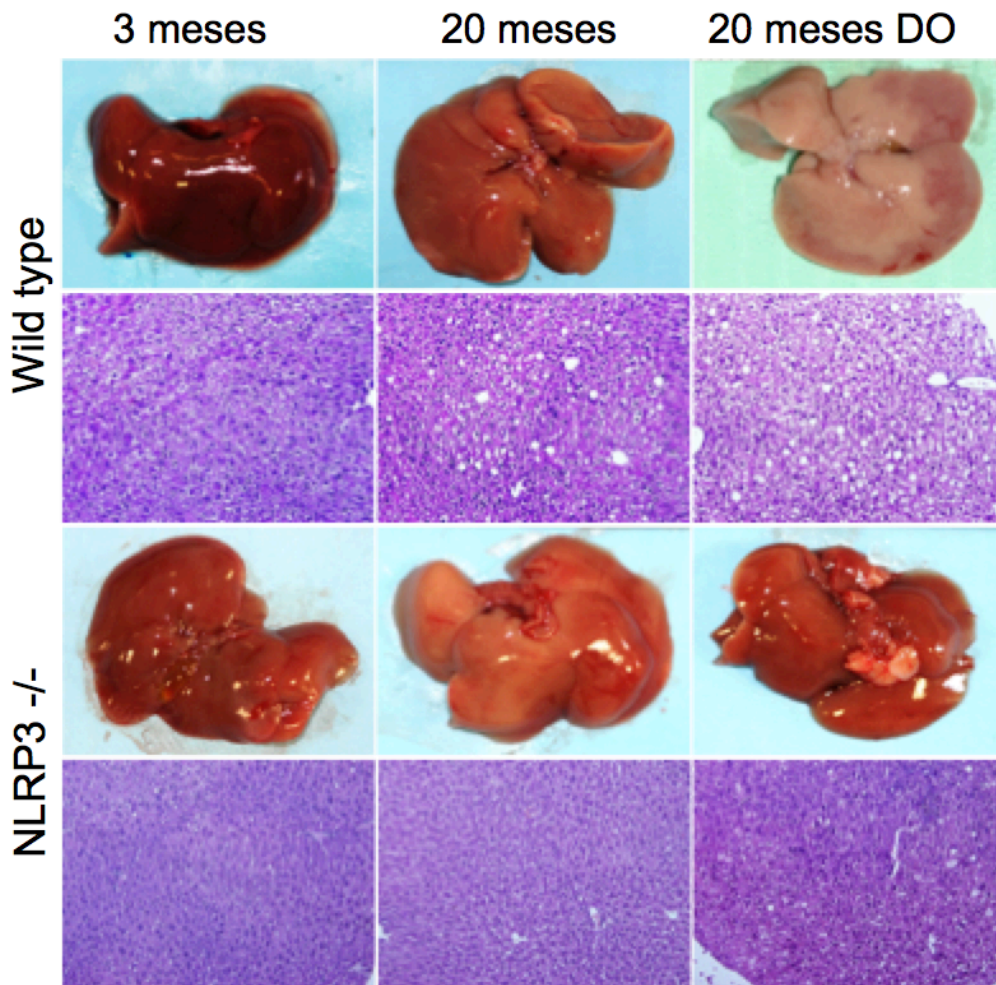


Figura 9. Ausencia de NLRP3 y la dieta obesogénica modifican la estructura y función hepática. Imagen representativa del aspecto macroscópico hepático y micrografías representativas teñidas con hematoxilina-eosina (400x) en cada uno de los grupos de estudio.

VI. DISCUSIÓN

Conforme avanzan las investigaciones, se tiene cada vez mayor certeza del papel fundamental que tiene la nutrición en el estado de salud general, así como en la forma y velocidad en la que envejecemos y aparecen patologías asociadas [100]. Existen evidencias de que modificaciones dietéticas ayudan a reducir el estado proinflamatorio asociado al envejecimiento [17]. La dieta mediterránea, con efectos beneficiosos demostrados para la salud [10], está abandonándose por dietas más occidentales en los países industrializados y desarrollados. Una nutrición caracterizada por un excesivo contenido calórico y elevado consumo de grasas, acompañado de un estilo de vida poco saludable desencadena problemas de obesidad con desarrollo y empeoramiento de patologías inflamatorias asociadas [16]. Nuestros resultados, con grupos de estudio envejecidos con dietas hipercalóricas demuestran cambios metabólicos, morfológicos, histológicos, en niveles autofágicos y de comportamiento, presentando a la nutrición como una variable a tener muy en cuenta en el proceso de envejecimiento y patologías asociadas.

El envejecimiento es el principal factor de riesgo y proceso patológico que desencadena las enfermedades cardiovasculares y metabólicas en personas sanas. Las principales vías moleculares que se dañan durante el envejecimiento comprometen vías de detección de nutrientes, como son el metabolismo de la glucosa, respuesta a la insulina, disregulación de la ruta mTOR y SIRT1 [49]. Así mismo, la inflamación tiene un papel fundamental en estos procesos durante el envejecimiento, ya sea de forma primaria o secundaria a los desórdenes metabólicos, siendo el nexo de unión entre envejecimiento y los procesos patológicos asociados.

Estos cambios que se dan mientras envejecemos están muy asociados a los estilos de vida, pudiendo ser acelerados por una vida sedentaria o una dieta hipercalórica característica de países desarrollados e industrializados, con dietas occidentales, favoreciendo el estado inflamatorio de bajo grado y las enfermedades relacionadas [165].

Nuestro estudio analiza cómo la inflamación, más específicamente el complejo NLRP3 inflamasoma, participa en los daños producidos durante el envejecimiento y que son agravados por una dieta alta en grasas. La inflamación crónica es un aspecto común en los tejidos envejecidos y en la mayoría de patologías relacionadas con la edad [202],

conllevando cambios en el metabolismo, degeneración y pérdida funcional, como es el caso de la función cardiaca [196]. Los resultados de nuestro estudio, evidencian cambios entre grupos ante una delección del gen NLRP3 y ante cambios en la dieta, modificando las rutas y vías que marcan las características del proceso de envejecimiento. Analizando los datos obtenidos, hay evidencia convincente de que la deficiencia de NLRP3 aumenta la longevidad incluso ante el efecto perjudicial de una dieta hipercalórica. Evidenciándose cambios metabólicos que pueden ser responsables de este aumento en la longevidad, destacando un aumento de la tolerancia a la glucosa con mayor sensibilidad a la insulina, reducción de los valores de leptina acompañado de incremento de adiponectina y una regulación de la dislipidemia que suele estar asociada a los procesos inflamatorios [197].

Los niveles de ingesta fueron mayores en los grupos con dieta alta en grasas tanto WT como NLRP3 $-/-$, debido a ser una dieta más apetecible y sabrosa. Sin embargo, la ganancia de peso en el grupo NLRP3 $-/-$ con dieta alta en grasas fue menor que en el grupo WT, relacionado con el mejor control de los cambios metabólicos que se produce ante la delección, induciendo una protección al desarrollo de obesidad frente a dietas hipercalóricas [194]. Así mismo, un deterioro en la salud mental y del comportamiento se asocia al envejecimiento y obesidad [33] pero pudimos analizar a través de la prueba de anidación y natación forzada cómo el grupo alimentado con dieta obesogénica WT había sufrido mayor deterioro que el grupo NLRP3 $-/-$ demostrando protección frente al deterioro cognitivo.

Los resultados metabólicos obtenidos en nuestro estudio confirman que la inhibición de NLRP3 mejora el daño producido en las vías metabólicas inducido por la edad y dietas obesogénicas. Niveles séricos bajos de adiponectina se han asociado a enfermedades coronarias, hipertrofia cardiaca del ventrículo izquierdo e hipertensión, con riesgo de infarto de miocardio [27, 28, 30]. La leptina es un conocido regulador del peso corporal y la disregulación del ratio leptina/adiponectina se ha asociado a enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico e hígado graso no alcohólico [26]. En base a ello, nuestros resultados muestran en los grupos de ratones jóvenes y en NLRP3 $-/-$ adultos alimentados con dieta estándar o dieta obesogénica niveles reducidos de leptina y del ratio leptina/adiponectina comparado con el grupo WT, correspondiéndose con un mejor control del peso corporal y efecto cardioprotector con prevención del desarrollo de desórdenes metabólicos ante situaciones de estrés como es una dieta alta en grasas

durante el envejecimiento. La adiponectina circulante aumentada obtenida en nuestros resultados, muestra mejor sensibilidad a la insulina, oxidación de grasas y prevención de obesidad.

La hipersensibilidad a la insulina con una mayor tolerancia a la glucosa, ya vista previamente en el fenotipo de ratones NLRP3 $-/-$ [204] se observa en los resultados de nuestro estudio, manteniéndose durante toda la vida de los ratones. En grupos jóvenes y NLRP3 $-/-$ envejecidos, incluso con dieta hipercalórica presentan valores en sangre de glucosa tras test de tolerancia a la glucosa reducidos en comparación con los ratones WT, mostrando prevención de problemas como la diabetes.

Niveles aumentados de IGF-1 se relacionan con disminución de resistencia al estrés y disfunción metabólica, sin embargo su reducción ha demostrado prevenir el envejecimiento celular y el inicio de patologías [77]. Otros estudios han demostrado que valores controlados de IGF-1 y niveles reducidos de glucosa circulante prolongan la vida útil con mayor resistencia al estrés y efectos antienvjecimiento [80]. En nuestros resultados observamos niveles séricos reducidos de IGF-1 en ratones NLRP3 $-/-$, muestra de una señalización reducida de insulina por mayor sensibilidad a la misma.

También observamos que la dislipidemia, asociada a los procesos inflamatorios durante el envejecimiento [49] se redujo en ratones NLRP3 $-/-$ envejecidos con dieta obesogénica en comparación con los grupos WT, con reducción de los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol, acompañado de un descenso de las transaminasas hepáticas, creatina fosfoquinasa, ácido úrico y creatinina. Siendo todos ellos marcadores de envejecimiento celular, lo cual relaciona nuestros resultados con la prevención de procesos inflamatorios y desórdenes metabólicos en los grupos con inhibición de NLRP3.

Valores aumentados de TNF- α son reflejo de inflamación sistémica, parte principal durante los procesos patológicos asociados a la obesidad y envejecimiento [121, 198]. Los diferentes valores de TNF- α obtenidos entre los diferentes grupos muestran cómo NLRP3 puede ser un objetivo para prevenir el fenotipo inflamatorio de bajo grado que caracteriza estos procesos patológicos. En el grupo donde se produjo su inhibición se obtuvieron los valores más bajos de TNF- α . La dermatitis ulcerosa es un desorden inflamatorio severo de la piel sin etiología conocida pero relacionado con el

envejecimiento en dietas altas en grasas [168]. Fueron observadas lesiones ulcerosas en los grupos WT alimentados con dieta obesogénica, no así en el grupo NLRP3 $-/-$, confirmándose el control inflamatorio y efecto protector de esta patología sobre el grupo con la inhibición.

Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de NLRP3, además de conllevar niveles séricos reducidos de IGF-1 ya analizados, también promueven otros cambios en las vías de detección de nutrientes relacionadas con el envejecimiento a nivel cardiaco, como son la disminución de la expresión de mTOR y un aumento en la expresión de SIRT-1. Además de ello, observamos una autofagia mejorada con menor apoptosis, participando todas estas vías metabólicas en la regulación de la longevidad [71]. La homeostasis cardiaca y hepática es parcialmente regulada por la quinasa mTOR. La vía mTOR ha sido muy estudiada por estar involucrada en el proceso de envejecimiento, su atenuación parcial es beneficiosa para la supervivencia celular y longevidad mediante una activación de la autofagia, manteniendo la homeostasis celular a través de degradación proteica y eliminación de los orgánulos intracelulares dañados. Inhibición genética y farmacológica de mTOR ya se ha visto que extiende la vida útil en un gran número de organismos [136] provocando una inducción de la autofagia. Sin embargo, la activación de la vía mTOR se relaciona con la hipertrofia cardiaca y complicaciones a este nivel [207]. Los ratones NLRP3 $-/-$ presentaban inhibición parcial de mTOR con efecto cardioprotector durante el envejecimiento, la fosforilación de mTOR estaba disminuida en el corazón de estos grupos.

En los mamíferos, se han identificado 7 genes de sirtuina (Sirt 1-7). SIRT1 parece regular procesos como la producción de glucosa e insulina, metabolismo de las grasas y la supervivencia celular, un aumento de Sirt1 se relaciona a un aumento de autofagia [86] y tiene un papel cardioprotector y de mejora del metabolismo durante el envejecimiento, relacionado a la inhibición de mTOR [90]. Los valores de expresión proteica SIRT 1, con efecto antioxidante y antiinflamatorio, se vieron elevados en ratones NLRP3 $-/-$ envejecidos con dieta obesogénica respecto a WT.

La autofagia es un mecanismo fundamental para preservar la homeostasis celular, viéndose su implicación en el mantenimiento de la estructura y función cardíaca en situaciones fisiológicas normales y patológicas [116, 138, 164]. La disfunción autofágica ha sido ampliamente relacionada con el envejecimiento y la obesidad, a

través de un bloqueo del flujo autofágico con acumulación de autofagosomas con sustratos no degradados [153]. Estudios previos han analizado cómo ratones con inhibición de NLRP3, presentan autofagia conservada durante el envejecimiento, incluso con una dieta alta en grasas a corto plazo [204], consiguiendo una autofagia mantenida durante todo el periodo vital.

Nuestros resultados muestran una mejora autofágica en ratones NLRP3 $-/-$ envejecidos con dieta obesogénica mediante el análisis del ratio LC3 II/LC3I en estudio conjunto con los valores reducidos de p62/SQSTM1. Una sobreexpresión de LC3 II puede ser debida a un aumento de la autofagia o a un deterioro del flujo autofágico, por ello estos cambios deben interpretarse junto con el estudio de los niveles de p62 /SQSTM1 cuyo déficit se relaciona con menor esperanza de vida y fenotipo envejecido prematuro por menor flujo autofágico [131]. La inhibición de NLRP3 induce mayor autofagia cardiaca durante el proceso de envejecimiento, previniendo también los efectos nocivos de una dieta hipercalórica sobre el corazón. Esta mejoría en la autofagia, demostrada mediante el análisis del tejido cardiaco, se mantiene durante todo el proceso vital.

El envejecimiento y la dieta alta en grasas se asocian a la apoptosis de cardiomiocitos, así como al estrés oxidativo y disregulación de procesos inflamatorios [153, 164], es por ello que analizamos biomarcadores apoptóticos en el tejido cardiaco. El envejecimiento reflejó un aumento de expresión de la proteína pro-apoptótica BAX respecto a ratones jóvenes en ambos grupos, con reducción en las dietas obesogénicas, encontrándose los valores más elevados en los grupos WT. Esto fue acompañado de aumento moderado de la proteína Bcl-2 antiapoptótica durante el envejecimiento, siendo mayor en NLRP3 $-/-$. Analizando el ratio BAX/Bcl-2 podemos determinar que el grupo NLRP3 $-/-$ presenta menor apoptosis debido a un aumento de la presencia de Bcl-2, que estimula la actividad antiapoptótica en el corazón, respecto al grupo WT.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en los países desarrollados, teniendo un papel fundamental la inflamación crónica en el avance de esta patología. El daño y envejecimiento cardiaco se caracteriza por hipertrofia, sobre todo del ventrículo izquierdo, aumento de peso, engrosamiento de la pared y fibrosis del tejido cardiaco, mitocondrias disfuncionales y disminución de la autofagia y el flujo autofágico [207]. Así mismo, la obesidad, como patología inflamatoria en sí, produce un envejecimiento cardiaco prematuro [20]. En base a ello, se entiende que la

estimulación autofágica mejoraría la función cardíaca al eliminar los desechos celulares acumulados. En nuestros resultados observamos que la delección de NLRP3 $-/-$ reduce los niveles de p62/SQSTM1, conllevando un aumento del flujo autofágico en los tejidos cardíacos de estos ratones envejecidos obesos, apreciándose menor fibrosis y menor hipertrofia cardíaca con pesos normalizados menores en los grupos adultos con dieta obesogénica y menor área de los cardiomiocitos vistos en los grupos NLRP3 $-/-$. Esta mejoría conseguida por aumento de la autofagia, previene el riesgo de muerte asociado a estas patologías en países desarrollados con dietas occidentales, asociándose a menor riesgo cardiovascular y mejoría de la función cardíaca. La inhibición de NLRP3, por tanto, sería fundamental para mejorar la longevidad y calidad de vida, extendiendo la vida útil y la duración de la salud en la última etapa de la vida.

Como parte de un envejecimiento fisiológico también se observan cambios morfológicos en el hígado. La esteatosis hepática y aparición de tejido fibrótico, así como niveles de colesterol y triglicéridos, transaminasas hepáticas, creatinina y ácido úrico aumentados se relacionan con marcadores de envejecimiento hepático. En los grupos NLRP3 $-/-$ se vieron reducidos estos valores, con una coloración hepática normal, en contraste con la palidez observada en WT. En el análisis histológico se aprecia mayor esteatosis y acumulación de lípidos en grupos WT.

Intervenciones antiedad han sido ya demostradas, como la rapamicina para actuar en la ruta mTOR [98], metformina en la activación de AMPK [140], restricción calórica a través de diferentes vías [102, 104] o el resveratrol a través de la activación de Sirt1 [124] actuando sobre vías metabólicas del envejecimiento con mecanismos comunes que consiguen mejorar la autofagia y reducir la inflamación con menor activación del inflamasoma NLRP3.

Nuestros resultados indican que la inhibición de NLRP3 puede tener un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis cardíaca, su delección mejora la función cardíaca y atenúa los efectos perjudiciales de un exceso de energía con dietas ricas en grasas, previniendo un envejecimiento metabólico y cardíaco, aumentando la vida útil en ratones machos obesos y mejorando la función cardíaca con mejor estado de salud en etapas avanzadas. Hay mejoría en las vías metabólicas relacionadas con dietas hipercalóricas como son la tolerancia a la glucosa, metabolismo de lípidos, ratio leptina/adiponectina y modulación de la señalización de IGF-1 y la vía mTOR,

consiguiendo además mejoría del flujo autofágico. NLRP3 parece tener un rol principal en la modulación de todas estas vías metabólicas por lo que se presenta como un objetivo fundamental de tratamiento para la prevención de las consecuencias metabólicas de una dieta y estilo de vida no saludable durante el envejecimiento, cada vez más común en los países industrializados y desarrollados. Cambios dietéticos y en el estilo de vida son las principales intervenciones necesarias para prevenir la obesidad y patologías cardíacas asociadas. Pero ante daños irreversibles del tejido cardíaco, con inflamación crónica, la inhibición del inflamasoma es una vía terapéutica a desarrollar para conseguir una adaptación autofágica que disminuya el daño y los cambios metabólicos, retrasando la aparición de enfermedades cardiovasculares.

Una vez conocidos los efectos beneficiosos del bloqueo de NLRP3 en la longevidad y función cardíaca, mayor número de estudios acerca de sus formas de inhibición se hacen necesarios para conseguir el efecto deseado cuando no es posible, o no es deseada por posibles problemas biológicos, la delección genética, sin verse alterada la respuesta inmune. La inhibición farmacológica de NLRP3 con la molécula MCC950 [203, 204] se muestra como una herramienta interesante para su inhibición selectiva pero más estudios son necesarios al respecto para conseguir actuar sobre estos procesos inflamatorios inhibiendo el complejo NLRP3 inflamasoma con fines terapéuticos.

VII. CONCLUSIONES

Primera. La inhibición de NLRP3 atenúa el daño cardíaco durante el envejecimiento inducido por una dieta hipercalórica debido a su papel principal en los procesos inflamatorios y participación en las vías metabólicas, previniendo la aparición de obesidad, con protección frente al estrés oxidativo, la inflamación cardíaca y patologías cardiovasculares.

Segunda. La nutrición tiene un papel fundamental en el estado de salud. Una dieta hipercalórica induce daño, actuando como elemento principal en el desarrollo de patologías inflamatorias y en el proceso de envejecimiento.

Tercera. La delección del complejo inflamasoma NLRP3 induce adaptación autofágica, consiguiendo reducción de la inflamación y controlando la apoptosis, con beneficios metabólicos consecuentes.

Cuarta. La inhibición de NLRP3 se plantea como posibilidad terapéutica ante enfermedades cardíacas y metabólicas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clegg ME, Williams EA. Optimizing nutrition in older people. *Maturitas*. **2018**; 112:34-38.
2. Zobel EH, Hansen TW, Rossing P, *et al*. Global Changes in Food Supply and the Obesity Epidemic. *Curr Obes Rep*. **2016**; 5:449-455.
3. Li, Z., Bowerman, S., Heber, D. Health ramifications of the obesity epidemic. *Surg. Clin. North Am*. **2005** 85, 681–701.
4. Elia M. Defining, Recognizing, and Reporting Malnutrition. *Int J Low Extrem Wounds*. **2017**; 16:230-237.
5. Magiorkinis E, Beloukas A, Diamantis A. Scurvy: past, present and future. *Eur J Intern Med*. **2011**; 22:147-52.
6. Minihane AM, Vinoy S, Russell WR, *et al*. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr*. **2015**; 114:999-1012.
7. Shikada T, Washio M, Nishizaki A, *et al*. Risk factors for coronary artery calcification in Japanese patients. *J Cardiol*. **2015**; 66:36-40.
8. Keys A. Seven Countries. A multivariate analysis of death and coronary heart disease. *Harvard University Press*. **1980** Cambridge
9. Keys A. Mediterranean diet and public health: personal reflections. *Am J Clin Nutr*. **1995**; 61:1321S-1323S.

10. Mataralas AL, Zampelas A, Stavrinou *et al.* The mediterranean diet: constituents and health promotion. *CRC Press*. **2001** Florida.
11. Katz DL, Meller S. Can we say what diet is best for health? *Annu Rev Public Health*. **2014**;35:83-103.
12. Shlisky J, Bloom DE, Beaudreault AR, *et al.* Nutritional Considerations for Healthy Aging and Reduction in Age-Related Chronic Disease. *Adv Nutr*. **2017**; 8:17-26.
13. Al-Khudairy L, Hartley L, Clar C, *et al.* Omega 6 fatty acids for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. **2015**; CD011094.
14. Severson T, Kris-Etherton PM, Robinson JG, *et al.* Roundtable discussion: Dietary fats in prevention of atherosclerotic cardiovascular disease. *J Clin Lipidol*. **2018**; 12:574-582.
15. Drouin-Chartier JP, Côté JA, Labonté MÈ, *et al.* Comprehensive Review of the Impact of Dairy Foods and Dairy Fat on Cardiometabolic Risk. *Adv Nutr*. **2016**; 7:1041-1051.
16. Johnson AR, Makowski L. Nutrition and metabolic correlates of obesity and inflammation: clinical considerations. *J Nutr*. **2015**; 145:1131S-1136S.
17. Calder PC, Bosco N, Bourdet-Sicard R, *et al.* Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition. *Ageing Res Rev*. **2017**; 40:95-119.

18. Meldrum DR, Morris MA, Gambone JC. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will? *Fertil Steril.* **2017**; 107:833-839.
19. Bhupathiraju SN, Hu FB. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circ Res.* **2016**; 118:1723-35.
20. Yatsuya H, Li Y, Hilawe EH, *et al.* Global trend in overweight and obesity and its association with cardiovascular disease incidence. *Circ J.* **2014**; 78:2807-18.
21. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, *et al.* Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med.* **1995**, 1: 1311-1314.
22. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, *et al.* Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* **1996**; 334:292-5.
23. Lee DW, Leinung MC, Rozhavskaya-Arena M, *et al.* Leptin and the treatment of obesity: its current status. *Eur J Pharmacol.* **2002**; 440:129-39.
24. Engin A. Adiponectin-Resistance in Obesity. *Adv Exp Med Biol.* **2017**; 960:415-441.
25. Xavier Palomer, Antonio Pérez, Francisco Blanco-Vaca. Adiponectin: a new link between obesity, insulinresistance and cardiovascular disease. *Med Clin* **2005**;124:388-95
26. DiNicolantonio JJ, Lucan SC, O'Keefe JH. The Evidence for Saturated Fat and for Sugar Related to Coronary Heart Disease. *Prog Cardiovasc Dis.* **2016**;58:464-72.

27. Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, *et al.* Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and metaanalysis. *Circulation*. **2006**, 114: 623-629.
28. Hong SJ, Park CG, Seo HS, *et al.* Associations among plasma adiponectin, hypertension, left ventricular diastolic function and left ventricular mass index. *Blood Press*. **2004**, 13: 236-242.
29. Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, *et al.* Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension*. **2004**, 43: 1318-1323.
30. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, *et al.* Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA*. **2004**, 291: 1730-1737.
31. Lavie CJ, McAuley PA, Church TS, *et al.* Obesity and cardiovascular diseases: implications regarding fitness, fatness, and severity in the obesity paradox. *J Am Coll Cardiol*. **2014**; 63:1345-54.
32. Lavie CJ, De Schutter A, Parto P, *et al.* Obesity and Prevalence of Cardiovascular Diseases and Prognosis-The Obesity Paradox Updated. *Prog Cardiovasc Dis*. **2016**; 58:537-47.
33. Avila C, Holloway AC, Hahn MK, *et al.* An Overview of Links Between Obesity and Mental Health. *Curr Obes Rep*. **2015**; 4:303-10.
34. Valenzuela R, Das UN, Videla LA, *et al.* Nutrients and Diet: A Relationship between Oxidative Stress, Aging, Obesity, and Related Noncommunicable Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. **2018** Jul 16;2018:7460453.
35. Salmon AB. Beyond Diabetes: Does Obesity-Induced Oxidative Stress Drive the Aging Process? *Antioxidants (Basel)*. **2016**; 5(3).

36. Scrocchi LA, Drucker, DJ. Effects of aging and a high fat diet on body weight and glucose tolerance in glucagon-like peptide-1 receptor -/- mice. *Endocrinology* **1998**; 139, 3127–3132.
37. P. Bullón, J.M. Morillo, M.C. Ramirez-Tortosa, *et al.* Metabolic syndrome and periodontitis: Is oxidative stress a common link?. *Journal of Dental Research* **2009**; 88; 503-518
38. Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* **2014**, 943162.
39. Gurevich-Panigrahi, T., Panigrahi, S., Wiechec, E., *et al.* Obesity: pathophysiology and clinical management. *Curr. Med. Chem.* **2009**; 16, 506–521.
40. Pi-Sunyer, X. The medical risks of obesity. *Postgrad. Med.* **2009**; 121, 21–33.
41. Goldstein DJ, Potvin JH. Long-term weight loss: the effect of pharmacologic agents. *Am J Clin Nutr.* **1994**; 60:647-57
42. Quiles JL, Ochoa JJ. Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. *Tratado de nutrición.* **2005**; 1.34: 1155-1190 . Ed. Acción Médica
43. Lipsky MS, King M. Biological Theories of Aging. *Dis Mon.* **2015**, 61: 460-466.
44. Wu H, Roks AJ. Genomic instability and vascular aging: a focus on nucleotide excision repair. *Trends Cardiovasc Med.* **2014**, 24: 61-68.

45. Vijg J, Suh Y. Genome stability and aging. *Annu Rev Physiol.* **2013**, 75: 645-668.
46. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* **1961**, 25: 585-621.
47. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* **1965**, 37: 614-636.
48. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell.* **2007**, 130: 223-233.
49. López-Otin C, Blasco MA. The hallmarks of aging. *Cell.* **2013**, 153: 1194-1217.
50. Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *Vivo (Brooklyn).* **2000**, 14: 183-188.
51. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* **2005**, 120: 513-522.
52. McCarthy Da, Clark RR, Bartling TR, *et al.* Redox-control of the senescence regulator Interleukin-1 α and the secretory phenotype. *J Biol Chem.* **2013**, 288: 32149-32159.
53. Krizhanovsky M, Yon RA, Dickins S, *et al.* Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell.* **2008**, 134: 657-667.
54. Byun H, Lee Y, Kim J. From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *BMB Rep.* **2015**, 48: 549-558.

55. Palmer AK, Tchkonina NK, LeBrasseur EN, *et al.* Cellular senescence in Type 2 Diabetes: a therapeutic opportunity. *Diabetes*. **2015**, 64: 2289-2298.
56. Smith DW. Evolution of longevity in mammals. *Mech Ageing Dev*. **1995**;81:51-60.
57. Belsky DW, Caspi A, Houts R, *et al.* Quantification of biological aging in young adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2015**; 112:E4104-10
58. Kunlin J. Modern biological theories of aging. *Ageing and Dis*. **2010**, 1:72-74.
59. Olovnikov AM. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol*. **1996**; 31:443-8.
60. Peng C, Wang X, Chen J, *et al.* Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *Biomed Res Int*. **2014**, 831841.
61. Pearl R, Winsor CP, White FB. The Form of the Growth Curve of the Canteloup (*Cucumis Melo*) under Field Conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1928**; 14:895-901.
62. Beckman KB, Ames BN. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews* **1998**; 78: 547-81.
63. Viña J, Borrás C, Miquel J. Theories of ageing. *IUBMB Life*. **2007**; 59:249-54.
64. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **2000**; 408: 239-47
65. Taylor RW, Barron MJ, Borthwick GM, *et al.* Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *J Clin Invest*. **2003**, 112: 1351-1360.

66. Brierley EJ, Johnson MA, Lightowlers RN, *et al.* Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: implications for the central nervous system and muscle. *Ann Neurol.* **1998**, 43: 217-223.
67. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* **1999**; 283:1482-8.
68. Müller-Höcker J. Cytochrome-c-oxidase deficient cardiomyocytes in human heart- an age-related phenomenon. A histochemical ultracytochemical study. *Am J Pathol.* **1989**, 134: 1167-1173.
69. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature.* **2005** 434:113-8.
70. Marín-Aguilar F, Pavillard LE, Giampieri F, *et al.* Adenosine Monophosphate (AMP)-activated Protein Kinase: a new target for nutraceutical compounds. *Int J Mol Sci.* **2016**, 18: 288.
71. Finkel T. The metabolic regulation of aging. *Nat Med.* **2015**, 21: 1416-1423.
72. Hardie DG. Amp-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* **2011**, 25: 1895- 1908.
73. Kim J, Yoon MY, Choi SL, *et al.* Effects of stimulation of amp- activated protein kinase on insulin-like growth factor 1- and epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem.* **2001**, 276: 19102-19110.

74. Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and sirt1 activity. *Nature*. **2009**, 458: 1056-1060.
75. Russell RR III, Li J, Coven DL, *et al.* Amp-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis and injury. *J Clin Invest*. **2004**, 114: 495-503.
76. McCarty, M. F. Chronic activation of AMP-activated kinase as a strategy for slowing aging. *Med. Hypotheses* **2004**; 63, 334–339.
77. Kenyon C, Chang J, Gensch E, *et al.* A *C elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. **1993**, 366: 461-464.
78. Suh Y, Atzmon G, Cho MO, *et al.* Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Aging Cell* **2008**; 105: 3438-42.
79. Fontana L, Vinciguerra M, Longo VD. Growth factors, nutrient signaling, and cardiovascular aging. *Circ Res*. **2012**;110:1139-50.
80. Van Heemst, D, Beekman M, Mooijaart SP, *et al.* Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell* **2005**; 4: 79-85.
81. Barzilai, N, A Bartke. Biological approaches to mechanistically understand the healthy life span extension achieved by calorie restriction and modulation of hormones. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **2009**; 64: 187-91.
82. Guttridge DC. Signaling pathways weigh in on decisions to make or brake skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. **2004**, 7: 443-450.

83. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol.* **2010**, 5: 253-295.
84. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The sir2/3/4 complex and sir2 alone promote longevity in *saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **1999**, 13: 2570-2580.
85. Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, *et al.* Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res.* **2008**, 102: 703- 710.
86. Alcendor RR, Gao S, Zhai P, *et al.* Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res.* **2007**, 100: 1512-1521.
87. Guarente, L, Picard, F. Calorie restriction—the SIR2 connection. *Cell* **2005**; 120, 473–482.
88. Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, *et al.* Sirt1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1: possible role in amp-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* **2008**, 283: 27628-27635.
89. Bordone L, Motta MC, Picard F, *et al.* Sirt1 regulates insulin secretion by repressing *ucp2* in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* **2006**, 4: e31.
90. Ghosh HS, McBurney M, Robbins PD. Sirt1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. *PLoS One.* **2010**, 5: e9199.
91. Sundaresan NR, Gupta M, Kim G, *et al.* Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting *foxo3a*-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest.* **2009**, 119: 2758-2771.

92. Hsu ZP, Zhai P, Yamamoto T, *et al.* Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/ reperfusion. *Circulation*. **2010**, 122: 2170-2182.
93. Tanno M, Kuno A, Horio Y, *et al.* Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. *Basic Res Cardiol*. **2012**; 107:273.
94. Gertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, *et al.* Ablation in mice of the mtorc components raptor, rictor, or mlst8 reveals that mtorc2 is required for signaling to akt-foxo and pkcalpha, but not s6k1. *Dev Cell*. **2006**, 11:859-871.
95. Kapahi P, Zid BM, Harper T, *et al.* Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol*. **2004**, 14: 885-890.
96. Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, *et al.* Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C Elegans*. *Nature*. **2003**, 426: 620.
97. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, *et al.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. **2009**, 460: 392-395.
98. McMullen JR, Sherwood MC, Tarnavsky O, *et al.* Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation*. **2004**, 109: 3050-3055.
99. Campisi J, Kim S, Lim C, *et al.* Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Experimental Gerontology* **2001**; 36: 1619-37
100. Bates CJ, Benton D, Biesalki HK, *et al.* Nutrition and aging: a consensus statement. *JNHA* **2002**; 6:103-16.

101. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the life-span and upon the ultimate body size. *J Nutr.* **1935**, 10-63.
102. Masoro EJ. Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* **2009**; 1790:1040-8.
103. Ingram DK, *et al.* Development of calorie restriction mimetics as a prolongevity strategy. *Ann. NY Acad. Sci.* **2004**; 1019, 412–423
104. Sinclair, D. A. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech. Ageing Dev.* **2005**; 126, 987–1002
105. Ingram DK. *et al.* Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Aging Cell* **2006**; 5, 97–108.
106. Hipkiss AR. Does chronic glycolysis accelerate aging? Could this explain how dietary restriction works? *Ann. NY Acad. Sci.* **2006**; 1067, 361–368.
107. Eskelinen G-L. New insights into the mechanisms of macroautophagy in mammalian cells. *International review of cell and mollecular biology.* **2008**. 266:207-247.
108. Liu Y, Bassham DC. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annual review of plan biology.* **2012**. 63:215-237
109. Murrow L, Debnath J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annual review of pathology.* **2013**. 8:105-137

110. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews in molecular and cell biology*. **2007**; 8:931-7.
111. Toth, S.E., The origin of lipofuscin age pigments. *Experimental Gerontology* **1968**. 3, 19–30.
112. Brunk, UT, Jones CB, Sohal RS, A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutation Research* **1992**; 275, 395–403.
113. Terman, A. The effect of age on formation and elimination of autophagic vacuoles in mouse hepatocytes. *Gerontology* **1995**. 41 (Suppl. 2), 319–326
114. Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *European Journal of Biochemistry* **2002**. 269, 1996–2002
115. Cuervo AM, Dice JF. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **2000**. 275, 31505–31513
116. Yamaguchi O, Otsu K. Role of autophagy in aging. *Journal of cardiovascular pharmacology*. **2012**, 60: 242-247.
117. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*. **2011**, 146: 682- 695.
118. Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet*. **2008**, 24: 604- 612.

119. de Magalhães JP, Curado J, Church GM. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics*. **2009** 25:875-81.
120. Cribbs DH, Berchtold NC, Perreau V, *et al.* Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *J Neuroinflammation*. **2012**; 9:179.
121. Singh T, Newman AB. Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res Rev*. **2011**;10:319-29.
122. Donati A, Cavallini G, Paradiso C, *et al.* Age-related changes in the autophagic proteolysis of rat isolated liver cells: effects of antiaging dietary restrictions. *Journal of Gerontology: Biological Sciences* **2001**. 56A, B375–B383,
123. Morselli E, Maiuri MC, Markaki M, *et al.* Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis*. **2010**;1:e10.
124. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. **2006**, 444: 337- 342.
125. Liu M, Wilk SA, Wang A, *et al.* Resveratrol inhibits mTOR signaling by promoting the interaction between mTOR and depTOR. *J Biol Chem*. **2010**, 285: 36387-36394.
126. Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, *et al.* Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol*. **2015**;16:1014-24.

127. Kim J, Kundu M, Viollet B, *et al.* AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* **2011**, 13: 132-141.
128. Kim J, Kim YC, Fang C, *et al.* Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell.* **2013**, 152: 290-303.
129. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* **2008**, 30: 214-226.
130. Mizushima N, Yoshimori T, Oshumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2011**, 27: 107-132.
131. Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol.* **2010**, 12: 119-131.
132. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, *et al.* Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* **2008**, 183: 795-803.
133. Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, *et al.* Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol.* **2009**, 11: 1305-1314.
134. Simonsen A, Cumming RC, Brech A, *et al.* Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy.* **2008**, 4: 176- 184.
135. Pyo JO, Yoo SM, Ahn HH, *et al.* Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun.* **2013**, 4: 2300.

136. Wu JJ, Liu J, Chen EB, *et al.* Increased mammalian lifespan and a segmental tissue-specific slowing of aging after genetic reduction of mTOR expression. *Cell Rep.* **2013**, 4: 913-920.
137. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, *et al.* In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell.* **2004** 15: 1101-11.
138. Wohlgemuth SE, Julian D, Akin DE, *et al.* Autophagy in the heart and liver during normal aging and calorie restriction. *Rejuvenation Res.* **2007**, 10: 281-292.
139. Alcocer-Gómez E, Garrido- Maraver J, Bullón P, *et al.* Metformin and caloric restriction induce an AMPK-dependent restoration of mitochondrial dysfunction in fibroblasts from Fibromyalgia patients. *Biochim Biophys Acta.* **2015**, 1852: 1257-1267.
140. Martin- Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, *et al.* Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun.* **2013**, 4: 2192.
141. Miquel J, Economos AC. Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol.* **1979**;14:279-85.
142. Sastre J, Asensi M, Gascó E, *et al.* Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol.* **1992**; 263(5 Pt 2):R992-5.
143. Jiang Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic Biol Med.* **2014**; 2014; 72:76-90

144. Dhanasekaran M, Ren J. The emerging role of coenzyme Q-10 in aging, neurodegeneration, cardiovascular disease, cancer and diabetes mellitus. *Curr Neurovasc Res.* **2005**; 2:447-59.
145. Kim J, Takahashi M, Shimizu T, *et al.* Effects of a potent antioxidant, platinum nanoparticle, on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev.* **2008**; 129:322-31.
146. Shintani T, Sakoguchi H, Yoshihara A, *et al.* d-Allulose, a stereoisomer of d-fructose, extends *Caenorhabditis elegans* lifespan through a dietary restriction mechanism: A new candidate dietary restriction mimetic. *Biochem Biophys Res Commun.* **2017** 493:1528-1533.
147. Kawakami S, Matsuda A, Sunagawa T, *et al.* Antioxidant, EUK-8, prevents murine dilated cardiomyopathy. *Circ J.* **2009**; 73:2125-34.
148. Mataix J, Ochoa JJ, Quiles JL. Olive oil, dietary fat and ageing, a mitochondrial approach. *Grasas y aceites* **2004**; 55: 84-91
149. Quiles JL, Ochoa JJ, Huertas JR, *et al.* Aspectos mitocondriales del envejecimiento. Papel del tipo de grasa de la dieta y el estrés oxidativo. *Endocrinología y nutrición* **2004**; 51: 107-20
150. Kim MJ, Morley JE. The hormonal fountains of youth: myth or reality? *J Endocrinol Invest.* **2005**; 28 (11 Suppl Proceedings):5-14. Review.
151. Zouboulis CC, Makrantonaki E. Hormonal therapy of intrinsic aging. *Rejuvenation Res.* **2012**; 15:302-12.

152. Lakkata EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises, part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*. **2003**, 107: 139-146.
153. Ren J, Sowers JR, Zhang Y. Metabolic Stress, Autophagy, and Cardiovascular Aging: from Pathophysiology to Therapeutics. *Trends Endocrinol Metab*. **2018**; 29:699-711
154. Leon LJ, Gustafsson ÅB. Staying young at heart: autophagy and adaptation to cardiac aging. *J Mol Cell Cardiol*. **2016**; 95:78-85.
155. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, *et al*. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*. **2007**; 13:619-24.
156. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, *et al*. NLRP3 inflammasomes are required for atherosclerosis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. **2010**, 464: 1357-1361.
157. Fuster V, Kelly BB. Promoting cardiovascular health in the developing world: a critical challenge to achieve global health. *Institute of Medicine (US) Committee on preventing the global epidemic of cardiovascular disease: meeting the challenges in developing countries*, **2010**.
158. Port S, Cobb FR, Coleman RE, *et al*. Effect of age on the response of the left ventricular ejection fraction to exercise. *N Engl J Med*. **1980**, 303: 1133-1137.
159. Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, *et al*. Cardiomyopathy of the aging human heart: myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res*. **1991**, 68:1560-1568.

160. Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, et al. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res.* **2000**, 87: 540-542.
161. Gerhard M, Roddy MA, Creager SJ, et al. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension.* **1996**, 27: 849-853.
162. Anversa P, Kajstura J, Leri A, et al. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation.* **2006**, 113: 1451-1463.
163. Hu FB. Globalization of food patterns and cardiovascular disease risk. *Circulation.* **2008**, 118: 1913-1914.
164. Hsu HC, Chen CY, Lee BC, et al. High-fat diet induces cardiomyocyte apoptosis via the inhibition of autophagy. *European journal of nutrition.* **2016**. 55: 2245-54.
165. Pavillard LE, Marín-Aguilar F, Bullón P, et al. Cardiovascular disease, NLRP3 inflammasome, and western dietary patterns. *Pharm Res.* **2018**, 131: 44-50.
166. Sanches Machado d'Almeida K, Ronchi Spillere S, Zuchinali P, et al. Mediterranean Diet and Other Dietary Patterns in Primary Prevention of Heart Failure and Changes in Cardiac Function Markers: A Systematic Review. *Nutrients* **2018**; 10 (1).
167. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* **2008**; 454: 428-35.
168. Neuhaus B, Niessen CM, Mesaros A, et al. Experimental analysis of risk factors for ulcerative dermatitis in mice. *Exp Dermatol.* **2012** 21:712-3.

169. Franceschi C, Capri M, Monti D, *et al.* Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech. Ageing Dev.* **2007**; 128: 92–105.
170. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science.* **2011**; 333: 1109–12.
171. Youm YH, Kanneganti TD, Vandanmagsar B, *et al.* The Nlrp3 inflammasome promotes age-related thymic demise and immunosenescence. *Cell Rep.* **2012**; 1: 56–68.
172. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010; 140: 821–32.
173. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.* **2011**; 29: 707–35.
174. Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, *et al.* The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity.* **2008**, 28:285-287.
175. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**; 27: 229–65.
176. Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, *et al.* The origins of age-related proinflammatory state. *Blood.* **2005**; 105: 2294–9.
177. Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev.* **2015** 24:29-39.

178. Agostini L, Martinon F, Burns K, *et al.* NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. **2004** 20:319-25.
179. O'Connor W Jr, Harton JA, Zhu X, *et al.* Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF- κ B suppressive properties. *J. Immunol.* **2003**; 171: 6329–33.
180. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, *et al.* Inflammasomes in health and disease. *Nature*. **2012**; 481: 278-86.
181. Lamkanfi M, Kanneganti TD. Nlrp3: an immune sensor of cellular stress and infection. *Int J Biochem Cell Biol.* **2010**, 42: 792– 795.
182. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. **1997**; 91: 295–8.
183. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **1994**; 12: 991–1045.
184. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, *et al.* Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* **2009**, 183: 787-791.
185. Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative stress activate inflammasomes: impact on the aging process and age-related diseases. *Cell Mol Life Sci.* **2012** 69:2999-3013.

186. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol.* **2010**, 10: 210–215.
187. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* **2011** 469:221-5.
188. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* **2013**, 13: 397-411.
189. Aachoui Y, Sagulenko V, Miao EA, et al. Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. *Curr Opin Microbiol.* **2013**, 16: 319-26.
190. Ting JP, Davis BK. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**; 23: 387–414
191. Youm YH, Grant RW, McCabe LR, et al. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab.* **2013**, 18:519-532.
192. Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol.* **2011**;166:1-15.
193. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2011**; 108:15324-9.

194. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med.* **2011**; 17:179-88.
195. Yin Y, Zhou Z, Liu W, *et al.* Vascular endothelial cells senescence is associated with NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome activation via reactive oxygen species (ROS)/thioredoxin-interacting protein (TXNIP) pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* **2017**; 84:22-34.
196. Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol.* **2018**; 15:505-522
197. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging.* **2012**; 4:166-75.
198. Bauernfeind F, Niepmann S, Knolle PA, *et al.* Aging-Associated TNF Production Primes Inflammasome Activation and NLRP3-Related Metabolic Disturbances. *J Immunol.* **2016**; 197:2900-8.
199. Goldberg EL, Dixit VD. Drivers of age-related inflammation and strategies for healthspan extension. *Immunol Rev.* **2015**; 265:63-74.
200. Chuang SY, Lin CH, Fang JY. Natural compounds and aging: between autophagy and inflammasome. *Biomed Res Int.* **2014**; 2014:297293.
201. Camell C, Goldberg E, Dixit VD. Regulation of Nlrp3 inflammasome by dietary metabolites. *Semin Immunol.* **2015**; 27:334-42.

202. Latz E, Duewell P. NLRP3 inflammasome activation in inflammaging. *Semin Immunol.* **2018**; 40: 61-73
203. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med.* **2015** ;21:248-55.
204. Pavillard LE, Cañadas-Lozano D, Alcocer-Gómez E, *et al.* NLRP3-inflammasome inhibition prevents high fat and high sugar diets-induced heart damage through autophagy induction. *Oncotarget.* **2017**; 8:99740-99756
205. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: Impact on the aging process. *Ageing Res Rev.* **2013**;12:520-34.
206. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, *et al.* The Beclin1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* **2011**, 18: 571-580.
207. North BJ, Sinclair DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res.* **2012**; 110:1097-108.

