

Restricción calórica: efectos metabólicos positivos e impacto celular

Raúl Julián Ortiz-Bautista,¹ Carlos Alberto Aguilar-Salinas,² Adriana Monroy-Guzmán³

Resumen

La restricción calórica de 30 a 60% de la ingestión calórica *ad libitum*, equilibrada y sin llegar a la malnutrición, es la estrategia no genética que ha logrado extender el promedio y el periodo máximo de vida de diversos organismos, desde microorganismos unicelulares como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, hasta primates *Rhesus*. Modelos genéticos y farmacológicos han mostrado que esta estrategia protege de enfermedades cardiovasculares, neurodegeneración y cáncer. Los estudios efectuados en primates sugieren que la restricción calórica retrasa la aparición de enfermedades asociadas con el envejecimiento, y en humanos implica efectos fisiológicos, bioquímicos y metabólicos que disminuyen los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes. Aunque en la actualidad se desconocen los mecanismos que generan los efectos positivos, a nivel celular se ha descrito disminución del estrés oxidativo, e incremento de la biogénesis mitocondrial.

Palabras clave: restricción calórica, estrés oxidativo, metabolismo, longevidad.

Abstract

Caloric restriction, as a 30 to 60% decrease of *ad libitum* balanced caloric intake, without malnutrition, is the non-genetic strategy that has consistently extended the average and maximum lifespan of most living beings, and it has been tested from unicellular organisms like yeast *Saccharomyces cerevisiae* to *Rhesus* primates. In addition, various genetic and pharmacological caloric restriction models have shown to protect against cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases. Primate studies suggest that this intervention delays the onset of age-related diseases; in humans, it has physiological, biochemical and metabolic effects decreasing diabetes and cardiovascular disease risk factor. Although currently the mechanism by which caloric restriction has its positive effects at the cellular level is unknown, it has been reported to decrease oxidative stress and increase in mitochondrial biogenesis.

Key words: Caloric restriction, oxidative stress, metabolism, longevity.

Introducción

Este artículo pretende revisar los efectos metabólicos de la restricción calórica hasta ahora reportados en el ser humano. Se expondrán los antecedentes de importancia y describirán algunas vías y procesos celulares en la restricción calórica.

Los avances en el conocimiento de las ciencias de la salud se reflejan en incremento en la esperanza de vida del ser humano, aunque esto no necesariamente implique mejor calidad de vida. De hecho, el envejecimiento se asocia con incremento del riesgo de padecer alteraciones metabólicas que incluyen: sobrepeso, obesidad, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, aterosclerosis y cáncer.¹

La restricción calórica, definida por Neel como la disminución de 30 a 60% de la alimentación *ad libitum* sin malnutrición,² es la estrategia no genética que, consistentemente, ha demostrado efectos metabólicos benéficos y ha conseguido extender el promedio y el periodo máximo de vida en la mayoría de los seres vivos en los que se ha probado, desde microorganismos hasta primates.

Antecedentes

La idea de que la restricción en la ingestión de alimento implica efectos benéficos para la salud y que, además, extiende el periodo de vida, se ha considerado desde hace al menos 500 años. Sin embargo, los primeros experimentos formales del efecto de la restricción calórica en la exten-

¹ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de las Américas Puebla.

² Departamento de Endocrinología y Metabolismo, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

³ Medicina Interna y Dirección de Investigación, Hospital General de México.

Correspondencia:

Dr. Raúl Julián Ortiz Bautista
Calle 7, Lote 52, Sección 16
14080 México DF.
Tel.: 8332166689
premed.rjob@hotmail.com

Recibido: 9 de enero 2013

Aceptado: 18 de junio 2013

sión de la esperanza de vida se atribuyen a McCay y sus colaboradores³ (1935), quienes por primera vez expusieron a un grupo de ratas a reducción en el consumo calórico del 40%, posterior al destete, y consiguieron 30% de incremento en su promedio de vida, en comparación con las ratas controles alimentadas *ad libitum*. Con este antecedente se iniciaron experimentos en una amplia variedad de especies, entre ellas la levadura *Saccharomyces cerevisiae*,⁴ el nemátodo *Caenorhabditis elegans*⁵ y el insecto *Drosophila melanogaster*,⁶ y en todas estas se demostraron los efectos benéficos similares a los reportados por McCay y su grupo.³ En ratones (*Mus musculus*),⁷ vacas (*Bos taurus*)⁸ y perros (*Canis domesticus*)⁹ la restricción calórica también tiene efectos benéficos en el promedio de vida. En primates se cuenta con estudios realizados por más de dos décadas por el National Institute of Aging (NIA) y el Wisconsin National Primate Research Center (WNPRC) lo que demuestra que esta intervención tiene efectos benéficos.

Restricción calórica en primates

Los reportes del NIA y del WNPRC resultan por demás interesantes, pues la estrecha relación filogenética y ontogénica de los seres humanos con los primates nos hace pensar que quizá estas observaciones pudieran aplicarse a la biología del envejecimiento del ser humano.

El estudio del NIA (iniciado en 1987) puso a monos de distintas edades en restricción calórica para evaluar sus efectos biológicos con respecto al momento de inicio de la misma. El estudio se realizó en 121 monos Rhesus (*Macaca mulatta*) jóvenes, adultos y viejos de ambos géneros. Los animales se dividieron en dos grupos: monos que iniciaron la restricción al ser jóvenes y monos viejos, con inicio de la restricción entre los 16 y 23 años.¹⁰

De los 86 monos incluidos en el grupo de inicio en edad joven, un porcentaje similar de animales control y expuestos a restricción murió debido a causas relacionadas con la edad (24 y 20%, respectivamente). Estos hallazgos contrastan con los estudios realizados por el WNPRC en monos adultos (7 a 14 años), que muestran que 13% del grupo en restricción murió por causas relacionadas con la edad, en comparación con 37% de los monos del grupo control.¹⁰

A pesar de que el grupo de monos de inicio jóvenes comen menos y pesan menos, los parámetros metabólicos no se modificaron, por ejemplo: las concentraciones de glucosa sérica en ayuno no fueron diferentes en los monos en restricción comparados con sus controles, y sólo los monos macho en restricción tuvieron una cifra ligeramente menor de triglicéridos comparados con sus respectivos controles ($p=0.051$). Sin embargo, la incidencia de cáncer sí disminuyó en este grupo de monos de inicio jóvenes ($p=0.028$,

en comparación con los controles), de hecho, no se identificaron neoplasias en ningún sujeto de este grupo. Finalmente, en los monos jóvenes en restricción se observó retraso en la maduración y crecimiento óseo.¹⁰

Respecto al grupo de monos que inició la intervención a mayor edad, los machos tuvieron una vida significativamente más larga en comparación con las hembras ($p=0.0003$), pero los que estuvieron en restricción tuvieron una supervivencia similar que la de sus controles, por lo que se concluye que el sexo no aporta una ventaja con respecto a la intervención. De este mismo grupo, sólo cuatro individuos en experimentación y uno alimentado *ad libitum*, han vivido 40 años. La restricción no ha incrementado el promedio ni el periodo máximo de vida con respecto a los controles; 50% de las hembras supervivientes tiene 27.8 años y los machos 35.4 años de edad;¹⁰ esto sobrepasa los 27 años aproximados del promedio de vida reportado para los monos en cautiverio.¹¹ Como parte del análisis de los parámetros metabólicos en este grupo, las concentraciones de triglicéridos, colesterol y glucosa se elevaron con la edad en hembras y machos del grupo control; sin embargo, estos parámetros fueron significativamente menores en el grupo bajo restricción, comparados con el grupo control.

La medición de plasma libre de isoprosano —un indicador de estrés oxidativo—, revela concentraciones mayores en machos control, comparados con los que estaban en restricción (23.41 ± 1.25 vs 15.93 ± 1.97 pg/mL⁻¹; $p=0.009$).¹⁰

La restricción calórica en monos *Rhesus* jóvenes y viejos del NIA no mejoró los resultados de supervivencia y tampoco redujo la incidencia de enfermedades cardiovasculares, como fue reportado en el WNPRC (hallazgos basados en estudios histopatológicos *postmortem*),¹⁰ aun cuando la pérdida de peso en ambos estudios fue similar. El contraste en los resultados entre los estudios NIA y WNPRC puede deberse a la distinta dieta que recibieron los monos, así como a los componentes de ésta, o a diferencias genéticas entre las cohortes de monos *Rhesus* estudiadas.

Restricción calórica en humanos

Aunque aún se desconoce si la restricción calórica modifica la esperanza de vida del ser humano, diversos estudios demuestran que esa intervención tiene efectos metabólicos positivos.

Desde hace más de 40 años se ha reportado una baja ingestión calórica en escolares en Okinawa, Japón y estudios posteriores confirmaron que los adultos residentes de la misma ciudad experimentaban una restricción de 20% en comparación con los demás habitantes de Japón.¹² En 2005, los reportes del Ministerio de Salud de Japón mostraron que tanto el promedio como el periodo máximo de vida

se incrementaron en los ciudadanos de Okinawa. Los mismos reportes indican que en contraste con la mayor parte de los países industrializados, la población tiene entre cuatro y cinco veces más centenarios en promedio, 50 por cada 100,000 personas.

El estudio Vallejo, con un diseño de ayuno terciado, incluyó a 120 hombres. Sesenta de los participantes del grupo en restricción calórica se alimentaron con 1500 Kcal por día durante tres años, cantidad aproximada a una restricción de 35%, comparada con el grupo control de 60 individuos alimentados *ad libitum*.¹³ Los análisis *post hoc* indican que la tasa de mortalidad tendió a la disminución en el grupo de intervención y las admisiones hospitalarias de estos individuos se redujeron 50%.¹⁴

En el estudio *Biosphere 2*, realizado en California, cuatro hombres y cuatro mujeres no obesos recibieron restricción calórica durante dos años. A los seis meses de la intervención se observó una disminución de 15% del peso corporal, lo que se asoció con mejoría en variables fisiológicas (disminución de la presión sistólica y diastólica), hematológicas (disminución de leucocitos), bioquímicas (disminución en glucosa y colesterol) y metabólicas (disminución en las concentraciones de insulina).¹⁵

El ensayo clínico aleatorizado y controlado en humanos no obesos, conocido como CALERIE (Comprehensive Assessment of the Long-term Effect of Reducing Intake of Energy), patrocinado por el NIA, estudia los efectos de la restricción al 25% en 150 hombres y mujeres saludables, de edad entre 25 a 45 años.¹ A los seis meses de la intervención 10% de este grupo tuvo disminución del peso corporal. Los estudios de imagen mostraron que la pérdida ponderal se atribuyó a la reducción significativa de 27% de la adiposidad visceral y de la adiposidad libre; sin embargo, la distribución de la adiposidad en el abdomen fue la misma en los grupos control y experimental.¹⁶ También se observó una reducción de 20% en el tamaño de los adipocitos subcutáneos de la región abdominal y 37% menor cantidad de lípidos en el hígado, pero no hubo cambios en el contenido de lípidos en el músculo esquelético.¹⁷

En roedores y primates se han identificado varios biomarcadores de longevidad, incluidas la temperatura corporal y algunas hormonas, como la dehidroepiandrosterona sulfatada (DHEA-S) y la insulina. En el estudio CALERIE dos de los tres biomarcadores de longevidad¹⁸ mejoraron luego de seis meses de restricción calórica.¹⁹ Se reportaron reducciones significativas de insulina en ayuno y de la temperatura corporal central, mientras que la DHEA-S permaneció sin cambios durante la intervención. Estos hallazgos concuerdan con los reportes previos de *The Baltimore Longitudinal Study of Aging*, realizado en primates no humanos, roedores en restricción y hombres longevos.¹⁸

En el mismo estudio CALERIE, seis meses de restricción redujeron significativamente las concentraciones de triglicéridos y del factor VIIc, en 18 y 11%, respectivamente.²⁰ El colesterol de alta densidad (HDL) se incrementó, mientras que el fibrinógeno, la homocisteína y la función endotelial permanecieron sin cambios. De acuerdo con los datos de colesterol total, colesterol HDL, presión sistólica, edad y género, el riesgo cardiovascular estimado a 10 años disminuyó en 28% a los seis meses.¹ También se observó mayor sensibilidad a la insulina en el grupo en restricción.¹⁷ La reacción aguda de la insulina en respuesta a la glucosa disminuyó 29% de la medición basal, lo que indica mejoría en la respuesta por parte de las células β^1 .

El gasto energético absoluto en 24 horas y la tasa metabólica durante el sueño, determinadas en cámara respiratoria, se redujeron significativamente ($p < 0.001$) en los grupos en restricción calórica con respecto al gasto energético basal. Estas respuestas fisiológicas se asociaron con reducción en la cantidad de estrés oxidativo, lo que se reflejó en menor daño al ADN en el grupo experimental pero no en los controles ($p = 0.0005$). Además, las concentraciones de 8-oxo7,8-dihidro-20 deoxiguanosina, marcador de daño nuclear, también se redujeron notablemente en el grupo en restricción comparados con el estado basal ($p < 0.0001$).¹⁹ Estos datos coinciden con los hallazgos reportados en animales, en donde se describió que la disminución en la ingesta calórica reduce la energía metabólica, el estrés oxidativo y el daño al ADN, efectos que a su vez se han asociado con disminución del proceso de envejecimiento.¹

Las hormonas tiroideas determinan el gasto energético y la tasa metabólica basal.²¹ Estudios a corto plazo en humanos en restricción calórica han reportado alteraciones en la función tiroidea. Cuatro semanas de completo ayuno disminuyen las concentraciones de triyodotironina (T3) e incrementan las de T3 reversa, lo que se asocia con disminución de la tasa metabólica.²² En los miembros de la Sociedad Internacional de Restricción Calórica, conocidos como los CRONies (CRON: Caloric Restriction with Optimal Nutrition) por sus siglas en inglés, que voluntariamente aceptaron la restricción calórica, también disminuyó significativamente la concentración de T3 pero no la de tiroxina (T4), ni de hormona estimulante de la tiroides (TSH).²³ En el estudio CALERIE, las concentraciones plasmáticas de T3 disminuyeron con respecto a la medición basal del grupo en restricción después de tres ($p < 0.01$) a seis meses ($p < 0.02$) de intervención.¹⁹

El envejecimiento en humanos sanos se asocia con disminución en las concentraciones de hormona del crecimiento (GH) y del factor de crecimiento análogo a la insulina tipo I (IGF-1).²⁴ A diferencia de lo reportado en roedores, en el estudio CALERIE, la pérdida de peso secundaria a la restricción energética aumenta las concen-

traciones de GH.²⁵ La concentración plasmática de grelina en ayuno, un secretagogo de la GH, aumentó significativamente en relación con la medición basal, pero el IGF-1 permaneció estable. A pesar de la reducción en el peso y en la adiposidad visceral, y de la mejoría en la sensibilidad a la insulina, el promedio de las concentraciones de GH permaneció sin cambios después de seis meses de intervención. Estos datos concuerdan con las mediciones de los individuos del estudio Biosphere.¹⁵

Impacto celular de la restricción calórica

Una de las máximas repercusiones de la restricción calórica a nivel celular es la disminución del estrés oxidativo^{26,27} que puede lograrse mediante varios mecanismos: decremento de la tasa a la que los radicales libres de oxígeno se generan, aumento de la tasa a la que estas especies reactivas de oxígeno (ROS) se detoxifican y activan el proceso de reparación para atenuar el daño producido. Existe evidencia que sugiere que la restricción calórica modula estos tres mecanismos que tienen como efecto global la reducción del estrés oxidativo.²⁸

La principal fuente celular de ROS es la mitocondria, donde el oxígeno se une con los electrones que pasan a través de la cadena transportadora de electrones para formar radicales superóxido (O_2^-). Los efectos de la restricción calórica en la producción mitocondrial de ROS aparentemente no están mediados por la reducción en la actividad de los componentes de la cadena transportadora de electrones. Un mecanismo clave sugerido en la modulación de la producción de ROS son los cambios en el potencial de membrana mitocondrial.²⁸ Este último tiene un efecto clave en la producción de radicales superóxido que modula la tasa a la que los electrones pasan a través de los componentes de la cadena transportadora de electrones, haciendo que estos sean más o menos susceptibles a la combinación con el oxígeno.²⁹ El potencial de membrana está determinado por el equilibrio entre la tasa a la que los protones son bombeados de la matriz al espacio de la membrana interna y por la tasa a la que estos protones pasan de regreso a la matriz. El flujo de protones que regresa a la matriz lo puede hacer por vía de la ATP sintasa (complejo V) y unirse, entonces, a la síntesis de ATP, o bien pueden “difundirse” de regreso a través de la membrana; ya sea solos o por canales específicos. Uno de los principales canales de membrana desacopladores de la síntesis de ATP que permiten la transferencia de protones hacia la matriz externa es la familia de proteínas desacoplantes (UCP) que incluyen a UCP1, encontrada en tejido adiposo pardo, UCP2 a lo largo de todo el organismo, UCP3 en el músculo esquelético y tejido adiposo pardo, UCP4 y UCP5 localizadas en el cerebro. Además, muchas otras pro-

teínas de membrana tienen actividad protonofórica, como la adenina nucleótido translocasa (ANT), que funciona principalmente como lanzadera de nucleótidos de purina hacia el interior de la mitocondria y fuera de ésta. En teoría, las concentraciones incrementadas o la activación de las UCP y de ANT deberían disminuir el potencial de membrana y reducir la producción de ROS,³⁰ lo que daría como resultado una membrana más estable, pues el daño a los lípidos de membrana se vería atenuado como consecuencia de menor producción de ROS.²⁸ La reducción en la producción de radicales libres durante la restricción calórica se relaciona con bajo consumo de oxígeno. Esta producción está regulada, también, por muchas otras condiciones fisiológicas (independientemente del consumo de oxígeno) propias de cada tejido y especie, por lo que la producción mitocondrial de ROS no es sólo resultado del proceso de respiración mitocondrial.³¹

La permeabilidad de la membrana está determinada por el tipo de ácidos grasos que la componen. Una membrana compuesta predominantemente de ácidos grasos insaturados es sumamente fluida y delgada para permitir que los protones pasen de regreso a la matriz y por ende sea menos eficiente la producción de ATP. Sin embargo, este tipo de membrana hace que el potencial de membrana esté disminuido.²⁸ Cuando hay restricción calórica se incrementan los ácidos grasos relativamente saturados (18:2 ácido linoleico, 18:3 ácido linolénico) a expensas de menor cantidad de ácidos grasos saturados de cadena larga, como: 20:4 ácido araquidónico, 22:5 ácido docosapentaenoico y 22:6 ácido docosahexaenoico.³² Esto implica la saturación de ácidos grasos en la membrana, lo que implica menor daño y mayor estabilidad, pues el doble enlace de los ácidos grasos insaturados es el propenso a la peroxidación por radicales libres.²⁸ Los cambios propiciados respecto a la saturación de los lípidos de membrana derivan por actividad de las elongasas y desaturasas,³³ que están bajo regulación de las concentraciones de hormona tiroidea, estos últimos disminuidos en la restricción calórica.³⁴

La última línea de defensa contra el estrés oxidativo es la mejora de la capacidad para reparar el ADN dañado, o aumentando la degradación de macromoléculas dañadas. La restricción calórica promueve la estabilidad genómica al incrementar la capacidad de reparación del ADN dañado, específicamente al reparar la escisión de bases.²⁸ Las sirtuinas, proteínas implicadas en la restricción, regulan la reparación y recombinación de ADN, la estabilidad cromosómica y la transcripción de genes en organismos inferiores.³⁵

Las sirtuinas (SIRT1 a SIRT7) son desacetilasas NAD+ dependientes que, aparentemente, regulan la actividad de muchas otras proteínas relacionadas con el metabolismo energético, supervivencia celular y longevidad.³⁶ En los mamíferos, la familia de las sirtuinas se divide en cuatro

clases: SIRT1-SIRT3 pertenecen a la clase I, SIRT4 a la clase II, SIRT5 a la clase III y SIRT6 y SIRT7 a la clase IV.³⁷ Cada una tiene funciones que varían con respecto a la especificidad por tejido, localización intracelular, actividad enzimática y blanco de acción. Las sirtuinas, en especial SIRT1, se han estudiado por el papel que juegan en la restricción calórica, la prevención en las enfermedades asociadas con la edad y el mantenimiento de la homeostasis metabólica.

La restricción calórica incrementa la expresión de SIRT1 en múltiples tejidos.^{38,39} SIRT1 controla las vías glucolíticas-gluconeogénicas en el hígado en respuesta al ayuno, mediante la interacción con el coactivador 1 α del receptor activado por los proliferadores de los peroxisomas (PGC-1 α). Una vez que SIRT1 es inducida desacetila a PGC-1 α en residuos de lisina de manera dependiente de NAD⁺,^{40,41} éste se traslada al núcleo y se une al factor nuclear respiratorio 1 (NRF-1) y activa la transcripción de genes mitocondriales, lo que resulta en biogénesis mitocondrial.⁴²

SIRT3, la mayor desacetilasa a nivel mitocondrial —expresada en su membrana interna—, parece también responder ante la restricción. Un mecanismo por el que SIRT3 responde a la restricción es que directamente desacetila y activa a la isocitrato deshidrogenasa (Idh2) mitocondrial, que permite el aumento de las concentraciones de NADPH

e incrementa la tasa de óxido-reducción del glutatión en la mitocondria.²⁸ SIRT3 también activa a la superóxido dismutasa (SOD)⁴³ y convierte a los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno. Las concentraciones elevadas de glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa convierten al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua, reduciendo de esta forma la producción de radicales hidroxilo tóxicos. Las bajas concentraciones de estos últimos disminuyen el daño oxidativo a las proteínas y al ADN.²⁸

El impacto celular de la restricción calórica en disminución de estrés oxidativo resulta de varios mecanismos bioquímicos, moleculares y celulares que interaccionan entre sí y que se resumen en la Figura 1.

Conclusión

La restricción calórica implica efectos benéficos en todos los niveles de organización del cuerpo humano; sin embargo, los mecanismos que subyacen a esta intervención para generar esos efectos no están claramente identificados. Aunque en distintos modelos experimentales se ha reportado el efecto de la restricción calórica en el periodo de vida, demostrar el efecto de longevidad en el ser humano requerirá mayor tiempo y arduo trabajo de investigación para determinarlos.

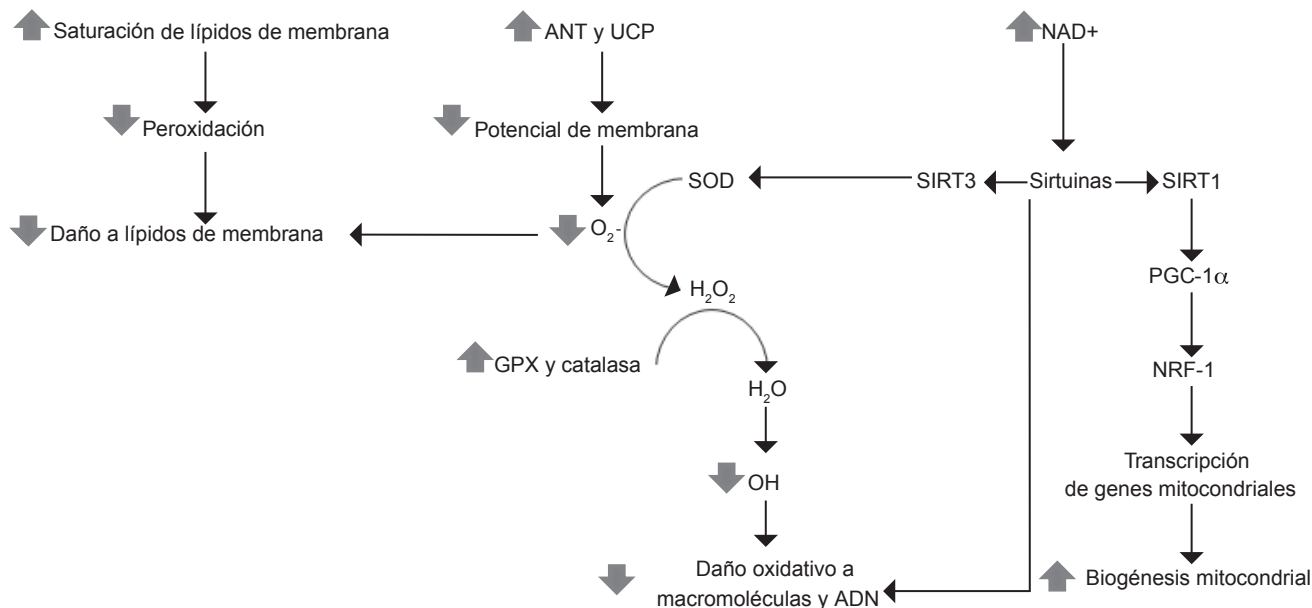


Figura 1. Repercusión de la restricción calórica en la célula.

Referencias

1. Redman LM, Ravussin E. Caloric Restriction in Humans: Impact on Physiological, Psychological, and Behavioral Outcomes. *Antioxidant Redox Signal* 2011;14:275-287.
2. Mercken EM, Carboneau BA, Krzysik-Walker SM, de Cabo R. Of mice and men: The benefits of caloric restriction, exercise, and mimetics. *Ageing Res Rev* 2012;11:390-398.
3. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life and upon the ultimate body size. *J Nutrition* 1935;10:63-79.
4. Fabrizio P, Longo VD. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2003;2:73-81.
5. Klass MR. Aging in nematode *Caenorhabditis elegans* -major biological and environmental-factors influencing life-span. *Mechanisms of Ageing and Development* 1977;6:413-429.
6. Burger JMS, Buechel SD, Kawecki TJ. Dietary restriction affects lifespan but not cognitive aging in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 2010;9:327-335.
7. Weindruch R. Effect of caloric restriction on age-associated cancers. *Experimental Gerontology* 1992; 27:575-581.
8. Pinney DO, Stephens DF, Pope LS. Lifetime Effects of Winter Supplemental Feed Level and Age at First Parturition on Range Beef Cows. *J Anim Sci* 1972;34:1067-1074.
9. Lawler DF, Larson BT, Ballam JM, Smith GK, Biery DN, Evans RH, et al. Diet restriction and ageing in the dog: major observations over two decades. *British J Nutr* 2008;99:793-805.
10. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 2012;489:318-321.
11. Colman RJ, Kemnitz JW. *Methods in Aging Research* (edited by Yu BP). Boca Raton, FL: CRC, 1998;249-267.
12. Suzuki M, Wilcox BJ, Wilcox CD. Implications from and for food cultures for cardiovascular disease: longevity. *Asia Pacific J Clin Nutr* 2001;10:165-171.
13. Vallejo EA. Hunger diet on alternate days in the nutrition of the aged. *Prensa Med Argent* 1957;44:119-120.
14. Stunkard AJ. Nutrition, longevity and obesity. *Nutrition, Aging and Obesity*. Rockstein M, Sussman ML, eds. New York: Academic Press, 1976;253-284.
15. Walford RL, Mock D, Verdery R, MacCallum T. Calorie Restriction in Biosphere 2: Alterations in Physiologic, Hematologic, Hormonal, and Biochemical Parameters in Humans Restricted for a 2-Year Period. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002;57:B211-B224.
16. Redman LM, Heilbronn LK, Martin CK, Alfonso A, Smith SR, Ravussin E. Effect of Calorie Restriction with or without Exercise on Body Composition and Fat Distribution. *J Clinical Endocrinol Metabol* 2007;92:865-872.
17. Larson-Meyer DE, Heilbronn LK, Redman LM, Newcomer BR, Frisard MI, Anton S, et al. Effect of Calorie Restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. *Diabetes Care* 2006;29:1337-1344.
18. Roth GS, Lane MA, Ingram DK, Mattison JA, Elahi D, Tobin JD, et al. Biomarkers of Caloric Restriction May Predict Longevity in Humans. *Science* 2002;297:811.
19. Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, et al. Effect of 6-Month Calorie Restriction on Biomarkers of Longevity, Metabolic Adaptation, and Oxidative Stress in Overweight Individuals. A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2006;295:1539-1548.
20. Lefevre M, Redman LM, Heilbronn LK, Smith JV, Martin CK, Rood JC, et al. Caloric restriction alone and with exercise improves CVD risk in healthy non-obese individuals. *Atherosclerosis* 2009;203:206-213.
21. Danforth E Jr., Burger A. The role of thyroid hormones in the control of energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;13:581-595.
22. Vagenakis AG, Burger A, Portnary GI, Rudolph M, O'Brian JR, Azizi F, et al. Diversion of Peripheral Thyroxine Metabolism from Activating to Inactivating Pathways During Complete Fasting. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;41:191-194.
23. Fontana L, Klein S, Holloszy JO, Premachandra BN. Effect of Long-Term Calorie Restriction with Adequate Protein and Micronutrients on Thyroid Hormones. *J Clin Endocrinol Metabol* 2006;91:3232-3235.
24. Veldhuis JD, Erickson D, Iranmanesh A, Miles JM, Bowers CY. Sex-steroid control of the aging somatotrophic axis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005;34:877-893.
25. Smith SR. The endocrinology of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996;25:921-942.
26. Merry BJ. Calorie restriction and Age-Related Oxidative Stress. *Molecul Cellular Gerontol* 2000;908:180-198.
27. Merry BJ. Oxidative stress and mitochondrial function with aging – the effects of calorie restriction. *Aging Cell* 2004;3:7-12.
28. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Molecul Aspects Med* 2011;32:159-221.
29. Brand MD, Affouit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biol Med* 2004;37:755-767.
30. Brand MD. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experiment Gerontol* 2000;35:811-820.
31. Barja G. Mitochondrial Oxygen Consumption and Reactive Oxygen Species Production are Independently Modulated: Implications for Aging Studies. *Rejuvenation Research* 2007;10:215-224.
32. Laganriere S, Yu BP. Modulation of Membrane Phospholipid Fatty Acid Composition by Age and Food Restriction. *Gerontology* 1993;39:7-18.
33. Brenner RR. Endocrine control of fatty-acid desaturation. *Bioch Soc Trans* 1990;18:773-775.
34. Hoch FL. Lipids and thyroid-hormones. *Prog Lipid Research* 1988;27(Suppl 2):199-270.
35. Hao CM, Haase VH. Sirtuins and Their Relevance to the Kidney. *J Am Society Nephrol* 2010;21:1620-1627.
36. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 2007;404:1-13.
37. Frye RA. Phylogenetic Classification of Prokaryotic and Eukaryotic Sir2-like Proteins. *Biochemical Biophysical Research Communications* 2000;273:793-798.
38. Kanfi Y, Peshti V, Gozlan YM, Rathaus M, Gil R, Cohen HY. Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability. *Febs Letters* 2008;582:2417-2423.
39. Masoro EJ. Role of sirtuin proteins in life extension by caloric restriction. *Mech Ageing Dev* 2004;125:591-594.
40. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 2005;434:113-118.
41. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Kim CLSH, Kim SH, Mostoslavsky R, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J* 2007;26:1913-1923.
42. Cascales M. Dieta hipocalórica y longevidad. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 2009;75:273-301.
43. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie Restriction Reduces Oxidative Stress by SIRT3-Mediated SOD2 Activation. *Cell Metabolism* 2010;12:662-667.