

## Rejuvant®, una formulación de un compuesto potencial para prolongar la vida con alfa-cetoglutarato y vitaminas, confirió una reducción promedio de 8 años en el envejecimiento biológico, luego de un promedio de 7 meses de uso, en la prueba de metilación del ADN TruAge

Oleksandr Demidenko<sup>1,\*</sup>, Diogo Barardo<sup>2,\*</sup>, Valery Budovskii<sup>1</sup>, Robb Finnemore<sup>3</sup>, Francis R. Palmer III<sup>3</sup>, Brian K. Kennedy<sup>2,3,4,5</sup>, Yelena V. Budovskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>TruMe Inc., Alameda, CA 94502, EE. UU.

<sup>2</sup>Programa de investigación traslacional de longevidad saludable, Yong Loo Lin School of Medicine, National University Singapore, Singapur 117456, Singapur <sup>3</sup>Ponce de Leon Health, Fernandina, FL 32034, EE. UU. <sup>4</sup>Centro para la longevidad saludable, National University Health System, Singapur 117456, Singapur

<sup>5</sup>Instituto de Ciencias Clínicas de Singapur, A\*STAR, Singapur 117609, Singapur

\*Aportación igual

Correspondencia a: Brian K. Kennedy, Yelena V. Budovskaya; correo electrónico: [bkennedy@nus.edu.sg](mailto:bkennedy@nus.edu.sg), [yelena@trumelabs.com](mailto:yelena@trumelabs.com)

Palabras clave: envejecimiento, metilación del ADN, alfa-cetoglutarato (AKG), edad biológica, Rejuvant Recibido: 5 de octubre de 2021

Aceptado: 15 de noviembre de 2021

Publicado: 30 de noviembre de 2021

Derechos de autor: © 2021 Demidenko et al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia [Creative Commons Attribution License \(CC BY 3.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/), que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se mencione el autor original y la fuente.

### ABSTRACTO

Continúa la búsqueda de posibles intervenciones que retrasen y/o reviertan el envejecimiento biológico, lo que resultará en una mayor duración de la vida y de la salud. Las intervenciones que retrasan el envejecimiento en modelos animales están bien establecidas; sin embargo, la mayoría carece de validación en humanos. La duración de la vida humana hace que sea poco práctico realizar un análisis de supervivencia. En cambio, se han desarrollado biomarcadores de envejecimiento, como los relojes de metilación del ADN (DNAm), para controlar la edad biológica. Aquí informamos un análisis retrospectivo de la edad de metilación del ADN en 42 personas que tomaron Rejuvant®, una formulación basada en alfa-cetoglutarato, durante un período promedio de 7 meses. Las pruebas de DNAm se realizaron al inicio y al final del tratamiento con suplementos de Rejuvant®. Sorprendentemente, los individuos mostraron una disminución promedio en el envejecimiento biológico de 8 años (valor  $p = 6.538 \times 10^{-12}$ ). Además, la suplementación con Rejuvant® es resistente a las diferencias individuales, como lo indica el hecho de que una gran mayoría de los participantes redujeron su edad biológica. Además, descubrimos que Rejuvant® es un beneficio adicional para las personas mayores cronológica y biológicamente. Si bien se requieren pruebas continuas, particularmente en un diseño controlado con placebo, es notable la reversión de casi 8 años en la edad biológica de las personas que toman Rejuvant® durante 4 a 10 meses, lo que hace que el cóctel de productos naturales sea un candidato intrigante para afectar el envejecimiento humano.

### INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso biológico casi universal que se manifiesta como una disminución general de la salud y la vitalidad, que finalmente conduce a la muerte. El envejecimiento está asociado con el desarrollo de una amplia gama de enfermedades crónicas, como el cáncer, el Alzheimer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y muchas otras afecciones [1, 2]. Si el envejecimiento puede ser

se prevendrá la aparición tardía de enfermedades crónicas, se mantendrá la capacidad funcional y, con toda probabilidad, se reducirán las complicaciones por enfermedades infecciosas, como el Covid 19 y la gripe [3]. En resumen, los humanos tendrán una vida útil y una vida más largas.

El envejecimiento suele medirse cronológicamente en días o años, con una mediana de supervivencia humana del orden de

ocho décadas. Si esperamos controlar el proceso de envejecimiento, debemos aprender a medir la tasa de envejecimiento en períodos de tiempo más cortos. Además, el envejecimiento progresa a diferentes ritmos en diferentes individuos. Nuestra verdadera edad biológica está influenciada por muchos factores adicionales, como antecedentes genéticos, estilo de vida y enfermedades. Para hacer frente a este desafío, se han desarrollado varios marcadores biológicos del envejecimiento. Estos marcadores son conjuntos únicos de moléculas o cambios en el estado epigenético del ADN de un individuo que reflejan su estado de envejecimiento actual [4–6]. Entre los biomarcadores más prometedores del proceso de envejecimiento se encuentran los patrones de metilación del ADN. La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que juega un papel importante en la regulación de la expresión génica, el desarrollo del organismo y la enfermedad [7, 8].

La metilación de los residuos de lisina dentro de las histonas centrales, H3 y H4, inicia una modificación conformacional en la estructura de la cromatina que se asocia con cambios en la actividad transcripcional. Sin embargo, la marca epigenética más estudiada es la metilación directa del propio ADN. Esta modificación implica la conversión de citosina en 5'-metilcitosina, catalizada por ADN metiltransferasas, y generalmente ocurre dentro de las secuencias de dinucleótidos CpG (CpG). Estas secuencias CpG, agrupadas en regiones conocidas como islas CpG (CGI), se encuentran con mayor frecuencia en promotores de genes domésticos [9, 10]. Se ha demostrado que la hipermetilación de las islas CpG está relacionada con el silenciamiento transcripcional, mientras que las islas CpG desmetiladas se encuentran con mayor frecuencia durante la embriogénesis y sirven como un sello distintivo de los genes transcritos activamente. Durante el envejecimiento, se han observado y caracterizado cuidadosamente dos tipos de cambios en la metilación del ADN: (1) deriva epigenética, o cambios estocásticos progresivos en los patrones de metilación del ADN entre individuos que ocurren con el aumento de la edad [11], y (2) el reloj epigenético: una medida derivada de la metilación del ADN que está altamente correlacionada con la edad cronológica y propuesta para medir la edad biológica [9, 12, 13].

El reloj epigenético es un biomarcador atractivo del envejecimiento porque se aplica a la mayoría de los tejidos humanos y captura aspectos de la edad biológica como la fragilidad [14], la aptitud cognitiva/física en los ancianos [15], la aceleración de la edad en la obesidad [16], el envejecimiento prematuro en el síndrome de Down [17] y la infección por VIH [18], el Parkinson [19] y las neuropatologías relacionadas con la enfermedad de Alzheimer [20], así como el cáncer [21] y el estrés de por vida [22]. Los marcadores de envejecimiento biológico representan una herramienta importante para validar clínicamente los efectos de las intervenciones basadas en la longevidad. Por primera vez, estos biomarcadores del envejecimiento brindan a los científicos la oportunidad de estudiar los efectos de los compuestos anti-envejecimiento en tiempo real y directamente en humanos. Uno de los años

compuestos descubiertos hasta la fecha es alfa-cetoglutarato (AKG) [23].

AKG es un metabolito intermediario endógeno en el ciclo de Krebs cuyos niveles disminuyen naturalmente durante el envejecimiento. AKG está involucrado en múltiples vías metabólicas y celulares. Estos incluyen el funcionamiento como una (una) molécula de señalización, donante de energía, precursor en la biosíntesis de aminoácidos y un regulador de los procesos epigenéticos y la señalización celular a través de la unión a proteínas [24–26]. La deficiencia de AKG en células madre y progenitoras aumenta con la edad [27]. A medida que los animales envejecen, la función mitocondrial se deteriora progresivamente y el flujo metabólico celular en las mitocondrias disminuye, lo que exacerba la deficiencia de AKG. Chin et al. informó que AKG aumentó la vida útil de *C. elegans* [28]. Sobre la base de estos resultados, se estudiaron en ratones AKG (y sal de calcio) combinados con otros compuestos generalmente reconocidos como seguros (GRAS). El ratón no alterado genéticamente es el modelo de mamífero preferido para estudiar el envejecimiento, ya que los procesos bioquímicos involucrados en el envejecimiento de los ratones pueden aplicarse a otros mamíferos, incluidos los humanos [29]. En un estudio reciente, patrocinado por Ponce de Leon Health y realizado en el Buck Institute for Research on Aging, se demostró el efecto del alfa-cetoglutarato (administrado en forma de sal de calcio - CaAKG) sobre la duración de la vida y la salud en ratones C57BL/6. informado. Los autores demostraron que en los ratones, AKG redujo la fragilidad y mejoró la longevidad, lo que indica una compresión de la morbilidad [23]. Estos y otros descubrimientos sugieren que AKG puede ser un candidato ideal para estudios humanos de longevidad prolongada.

En este estudio, examinamos la asociación transversal y longitudinal entre el reloj epigenético, el estado de salud, la condición física y los efectos de tomar Rejuvant® (CaAKG de liberación sostenida + una vitamina específica según el sexo) sobre el envejecimiento biológico humano. Seguimos a 42 personas sanas autoinformadas que habían tomado suplementos de AKG durante un período de 4 a 10 meses. Se discuten los efectos de AKG sobre el envejecimiento biológico y la posible correlación de otros efectos fisiológicos.

## RESULTADOS

Para este estudio, revisamos a 42 participantes que habían elegido tomar Rejuvant® por un período de 4 a 10 meses. Todos los participantes tomaron activamente el producto Rejuvant®. La necesidad de seguir este estudio con un estudio controlado con placebo se describe en la Discusión. Las características generales de esta cohorte se describen en la Tabla 1. Todos los participantes reportaron un estado de salud bueno o excelente sin ninguna condición médica crónica.

Se ve un aumento más pronunciado en

Tabla 1. Características descriptivas de los participantes del estudio.

Participantes totales	42
Genero femenino masculino)	14/ 28
Femenino:	
Edad cronológica (mediana; rango)	64,09; 43,49 a 72,46 62,15;
Edad biológica al inicio (mediana; rango)	46,4 a 73 55,55; 33,4 a
Edad biológica en T7* (mediana; rango)	63,7
Masculino:	
Edad cronológica (mediana; rango)	62,78; 41,31 a 79,57 61,85;
Edad biológica al inicio (mediana; rango)	41,9 a 79,7 53,3; 33 a 74,9
Edad biológica en T7* (mediana; rango)	

\*Indica la edad biológica medida por la prueba TruMe después de un promedio de siete meses de tratamiento.

siguió fumando durante todo el estudio. La mayoría de los participantes del estudio (66,7%, n = 28) eran hombres. La edad cronológica media de esta cohorte fue de aproximadamente 63 años.

Para los 42 participantes, pudimos medir la edad biológica inicial usando el modelo de predicción de edad TruMe antes de que comenzaran a tomar Rejuvant®. Utilizamos el modelo de predicción TruAge con secuenciación de Sanger para el análisis de metilación del ADN. En total, se analizaron 3 genes, incluidos 9 sitios CpG, mediante la secuenciación de Sanger. Los valores de metilación del ADN obtenidos para todos los sitios CpG se incluyeron en el modelo de predicción de edad TruMe (publicación pendiente).

Evaluamos el error de predicción de la prueba epigenética TruAge, como se describió anteriormente. La comparación de los valores de edad previstos frente a los reales arroja un error absoluto medio de 4,23 años. El error medio de 0,35 años muestra que esta población en su conjunto puede ser un poco más joven de lo esperado. Se sabe que la normalización previa al procesamiento de los conjuntos de datos de metilación del ADN y su variación de edad pueden sesgar la diferencia entre la edad estimada y la cronológica. Una medida de la solidez de estos factores consiste en calcular los residuos de una regresión lineal de la edad prevista frente a la real. Encontramos que la edad estimada tiene un coeficiente de regresión de 0,88 y que la regresión lineal (línea ajustada en la Figura 1) mostró un R-cuadrado ajustado de 0,59 con un error absoluto medio de 3,97 años. Finalmente, también encontramos una correlación lineal de Pearson estadísticamente significativa (valor de  $p = 2,026 \times 10^{-9}$ ) de 0,77 (IC del 95 %: 0,61 a 0,87) entre la edad estimada y real de nuestra cohorte al inicio del estudio.

También consideramos si había un sesgo de sexo en la evaluación de la edad biológica analizando a los hombres (28) y las mujeres (14) por separado. Siguiendo el mismo procedimiento que antes, para los hombres encontramos un error absoluto medio de

la edad prevista frente a la real de 4,92 años y un error medio de -0,22 años. La mediana del error absoluto de la regresión lineal fue de 4,64 años, con un R cuadrado ajustado de 0,6 y un coeficiente de regresión de 0,90 (Figura 2). Además, la edad estimada y real al inicio del estudio para los hombres se correlacionó linealmente (valor de  $p = 7,74 \times 10^{-7}$ ) con una magnitud de 0,78 (IC del 95 %: 0,58 a 0,9). Para las mujeres, el procedimiento de regresión análogo mostró una mediana de error absoluto de 3,887 años, con un R-cuadrado ajustado de 0,51 y un coeficiente de regresión de 0,83 (Figura 2). Además, encontramos una mediana de error absoluto de la edad prevista frente a la real de 3,41 años. El error medio de 1,48 años podría indicar que es probable que las mujeres de nuestra cohorte sean más jóvenes de lo esperado. Para explorar esto, aplicamos una regresión multilínea con el género como variable adicional a toda nuestra cohorte. No se encontró que el sexo fuera un predictor estadísticamente significativo de la edad cronológica al inicio del estudio (Tabla 2). Además, hubo una correlación lineal estadísticamente significativa (valor de  $p = 0,002$ ) de 0,74 (IC del 95 %: 0,35 a 0,91) entre la edad estimada y la real al inicio del estudio para las mujeres. En conclusión, dentro del contexto de este conjunto de datos limitado, no hubo diferencia estadística en la capacidad predictiva de la prueba epigenética TruAge con respecto a hombres y mujeres.

Los participantes completaron una encuesta al comienzo y al final del ensayo. Este cuestionario autoadministrado incluía información sobre la dieta, el consumo de alcohol, el consumo previo de Rejuvant®, la salud, la altura y el peso (lo que permitió estimar el IMC), la duración del sueño, el tabaquismo, la frecuencia del ejercicio, el nivel de actividad física, la frecuencia de las comidas, los refrigerios frecuencia, número de suplementos dietéticos adicionales consumidos y frecuencia, estado del cabello, educación, mentalidad de estilo de vida saludable y confianza en los suplementos dietéticos (Tabla complementaria 1).

Aprovechamos la información de la encuesta de referencia para verificar si había otros factores de confusión en nuestra cohorte, realizando

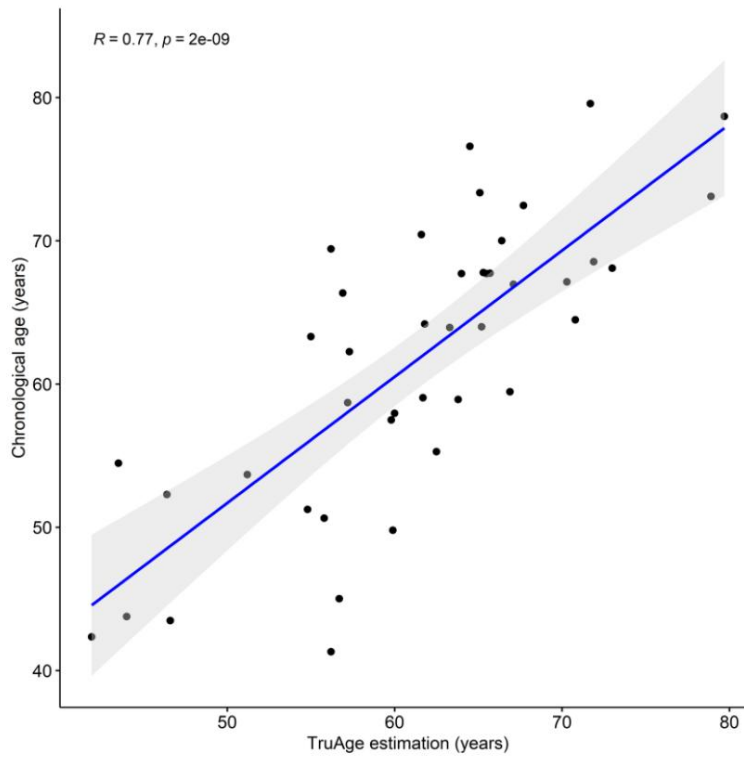


Figura 1. La estimación de la edad de TruAge y la edad cronológica de referencia están linealmente correlacionadas. La edad biológica TruAge está altamente (R-cuadrado ajustado = 0,77) estadísticamente significativa (valor  $p = 2 \times 10^{-9}$ ) correlacionada con la edad cronológica de los 42 pacientes.

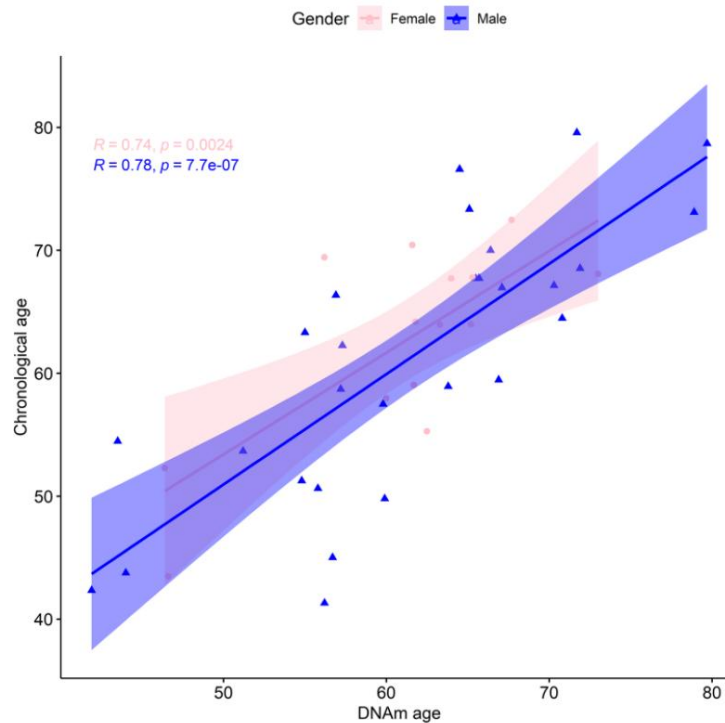


Figura 2. La estimación de la edad de TruAge y la edad cronológica de referencia están linealmente correlacionadas, en ambos sexos. El eje x representa la edad de metilación del ADN estimada por TruAge y el eje y la edad cronológica de los 42 pacientes al inicio del estudio. Los gráficos de correlación lineal rosa y azul representan la correlación lineal estadísticamente significativa similarmente alta entre ambos ejes, para pacientes femeninos y masculinos, respectivamente.

Tabla 2. Efecto de Rejuvant® sobre la edad biológica de los participantes del estudio.

Distribuciones biológicas de edad	Participantes hombres (en años)	Mujeres participantes (en años)
Edad biológica mínima al inicio		
Edad biológica mediana al inicio	61,85	62,15
Edad biológica media al inicio	61,38	61,09
Edad biológica máxima al inicio	79,7	73
Edad biológica mínima en T7*	33	33,4
Edad biológica mediana en T7*	53,3	55,55
Edad biológica media en T7*	53,53	54,66
Edad biológica máxima en T7*	74,9	63,7
Cambio mínimo en la edad biológica	-1,86	-0,41
Cambio medio en la edad biológica	7,09	5,83
Cambio medio en la edad biológica	8,44	6,98
Cambio máximo en la edad biológica	22,7	14,09

\*Indica la edad biológica medida por la prueba TruMe después de un promedio de siete meses de tratamiento.

una regresión lineal multivariable. Debido al considerable número de variables predictivas, realizamos una regresión lineal por pasos. Aunque hubo covariables adicionales seleccionadas en el modelo paso a paso, cuando se comparó, mediante análisis de varianza, con la regresión lineal univariada más simple utilizando únicamente la edad estimada de TruAge, el valor de p obtenido fue 0,12 (Tabla complementaria 2). Esto indica que en términos de comparación, los dos modelos no son significativamente diferentes desde el punto de vista estadístico y, por lo tanto, se seleccionó el modelo más simple.

Fue de interés determinar si la diferencia entre la edad cronológica y TruAge está relacionada con el estilo de vida o factores demográficos. En otras palabras, es importante evaluar si estas covariables están asociadas con individuos biológicamente más jóvenes o mayores. Seleccionamos el IMC, el consumo de alcohol, la autoevaluación de la salud, la duración del sueño, el historial de tabaquismo, la frecuencia e intensidad del ejercicio y la abundancia de cabello como variables predictoras, ya que este subconjunto de la información recopilada de la encuesta puede estar claramente asociado con la edad biológica y/o influir en ella. La regresión lineal por pasos no encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre ninguna de estas variables con la diferencia entre la edad cronológica y biológica TruAge (Tabla complementaria 2). Cabe destacar que el número de participantes es bastante pequeño (por ejemplo, hubo un fumador y solo 6 informaron antecedentes de tabaquismo). Por lo tanto, es probable que uno o más de estos parámetros de estilo de vida influyan en la edad biológica medida por la prueba TruAge y que un conjunto de datos más grande descubra asociaciones.

#### Resultados del consumo de CaAKG sobre la edad biológica

El objetivo del estudio fue determinar el efecto de Suplementación con Rejuvant® sobre el envejecimiento biológico humano

midiendo la metilación del ADN. Después de la medición inicial, a cada participante del estudio se le suministró Rejuvant® durante la duración del estudio. Aunque se aconsejó a los participantes que usaran el tratamiento durante 4 a 6 meses, hubo diferencias individuales considerables en la duración del tratamiento. Al finalizar el período de tratamiento elegido por ellos mismos, los participantes enviaron sus muestras de saliva para analizar su edad biológica utilizando pruebas TruMe disponibles comercialmente.

Según los cuestionarios enviados al inicio y al final del ensayo, identificamos un subconjunto de 13 personas que no informaron cambios en el tipo de dieta, la frecuencia de consumo, la ingesta adicional de suplementos dietéticos, la duración del sueño y la frecuencia del ejercicio. Por lo tanto, este subconjunto homogéneo se utilizó para la evaluación preliminar del efecto independiente de CaAKG, ya que las otras covariables están controladas por diseño.

Al inicio del estudio, este subconjunto o nuestra cohorte era en promedio 2,06 años biológicamente más joven que su edad cronológica.

Al final del tratamiento, esta subpoblación era en promedio 9,74 años biológicamente más joven que su respectiva edad cronológica. Utilizando la prueba t pareada de dos muestras de Welch unilateral, se encontró que esta diferencia en las medias de 7,69 años era estadísticamente significativa, con un valor p de  $7,263 \times 10^{-5}$  (Figura 3). Cabe señalar que todos los sujetos de este pequeño grupo disminuyeron su edad biológica.

Después de descubrir que la suplementación con CaAKG disminuyó constantemente la edad epigenética en una pequeña población homogénea, continuamos evaluando sus efectos en toda la cohorte de 42 pacientes. Al inicio del estudio, la cohorte era en promedio 0,35 años biológicamente más joven que su edad cronológica. Al final del tratamiento, este valor cambió a un promedio de 8,31 años biológicamente más jóvenes que sus respectivos

edad cronológica. Usando la prueba t pareada de dos muestras de Welch unilateral, se encontró que esta diferencia en las medias de 7,96 años era estadísticamente significativa, con un valor p de  $6,538 \times 10^{-12}$  (Figura 4).

La formulación del suplemento Rejuvant® es diferente para hombres y mujeres. Más concretamente, además de CaAKG, se añaden vitamina A y vitamina D

a la formulación comercial para hombres o mujeres, respectivamente (ver Métodos). Independientemente, el efecto de la suplementación con Rejuvant® disminuye la edad epigenética de manera estadísticamente significativa en hombres y mujeres (Figura 5). La disminución media pareada es de 8,44 años en los hombres y de 6,98 años en las mujeres. Solo 2 individuos (1 macho y 1 hembra) exhibieron un ligero aumento en la edad biológica.

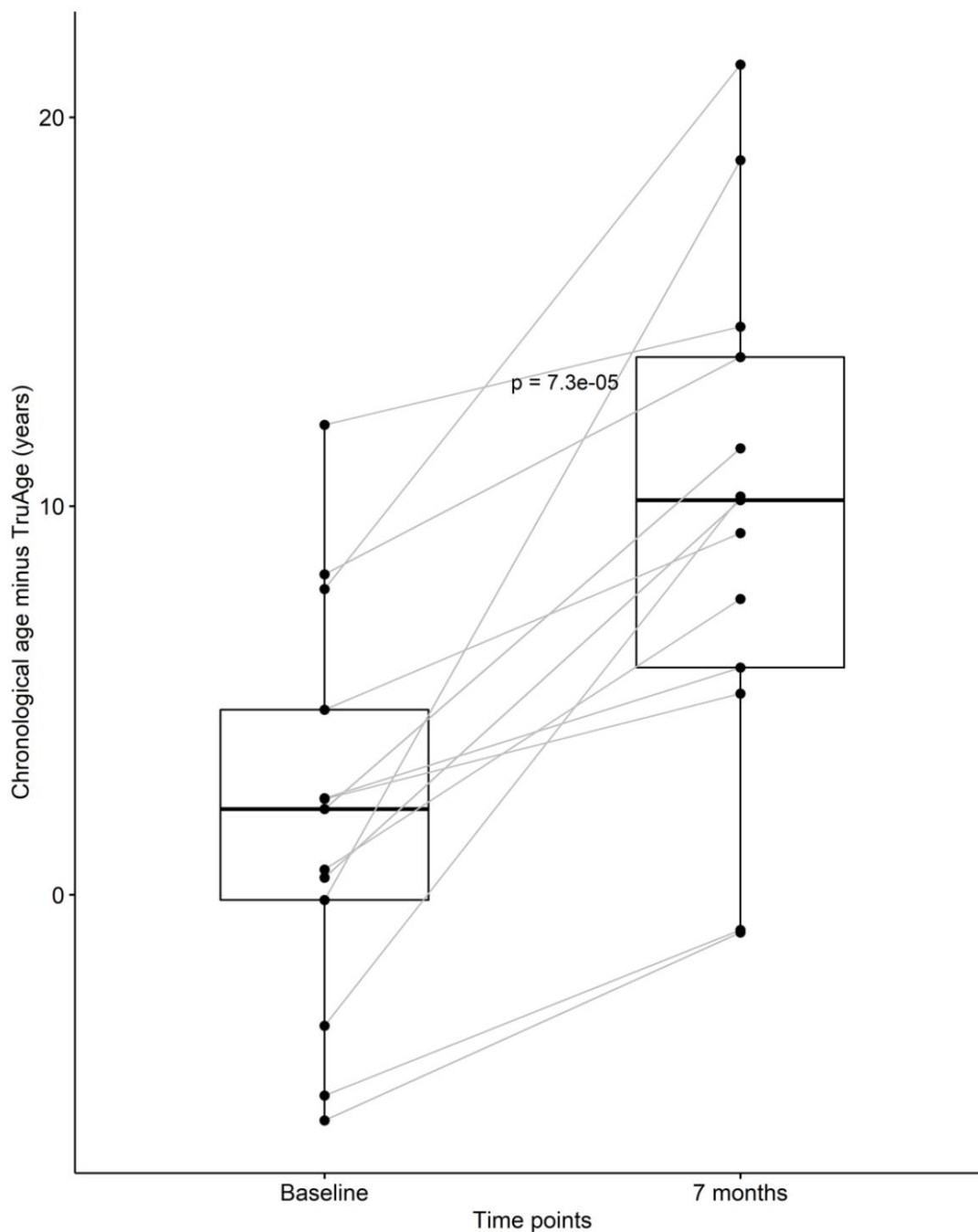


Figura 3. CaAKG disminuyó la edad de metilación entre una subpoblación homogénea. Los diagramas de caja emparejados representan los efectos del tratamiento a nivel de paciente y grupo ( $n=13$ ), entre el inicio y el final del ensayo (que en promedio tuvo una duración de 7 meses). Los diagramas de caja representan la mediana y los cuartiles 25 y 75 .

La validez del análisis estadístico que utiliza la cohorte completa se basa en el modelado de covariables, para la detección de variables que dan como resultado una diferencia estadísticamente significativa en la prueba de metilación del ADN TruMe, utilizamos regresiones paso a paso de forma iterativa. Este procedimiento culminó en el modelo más parsimonioso utilizando solo la edad cronológica de referencia y la diferencia entre las

las edades cronológicas y biológicas basales, como únicos predictores estadísticamente significativos de la magnitud de la disminución de la edad epigenética por parte de Rejuvant®. En consecuencia, modelamos el efecto de la suplementación con Rejuvant® sobre la edad de metilación como una regresión lineal de estas dos variables. Estos datos indican que aquellas personas con mayor edad biológica (respecto a su edad cronológica)

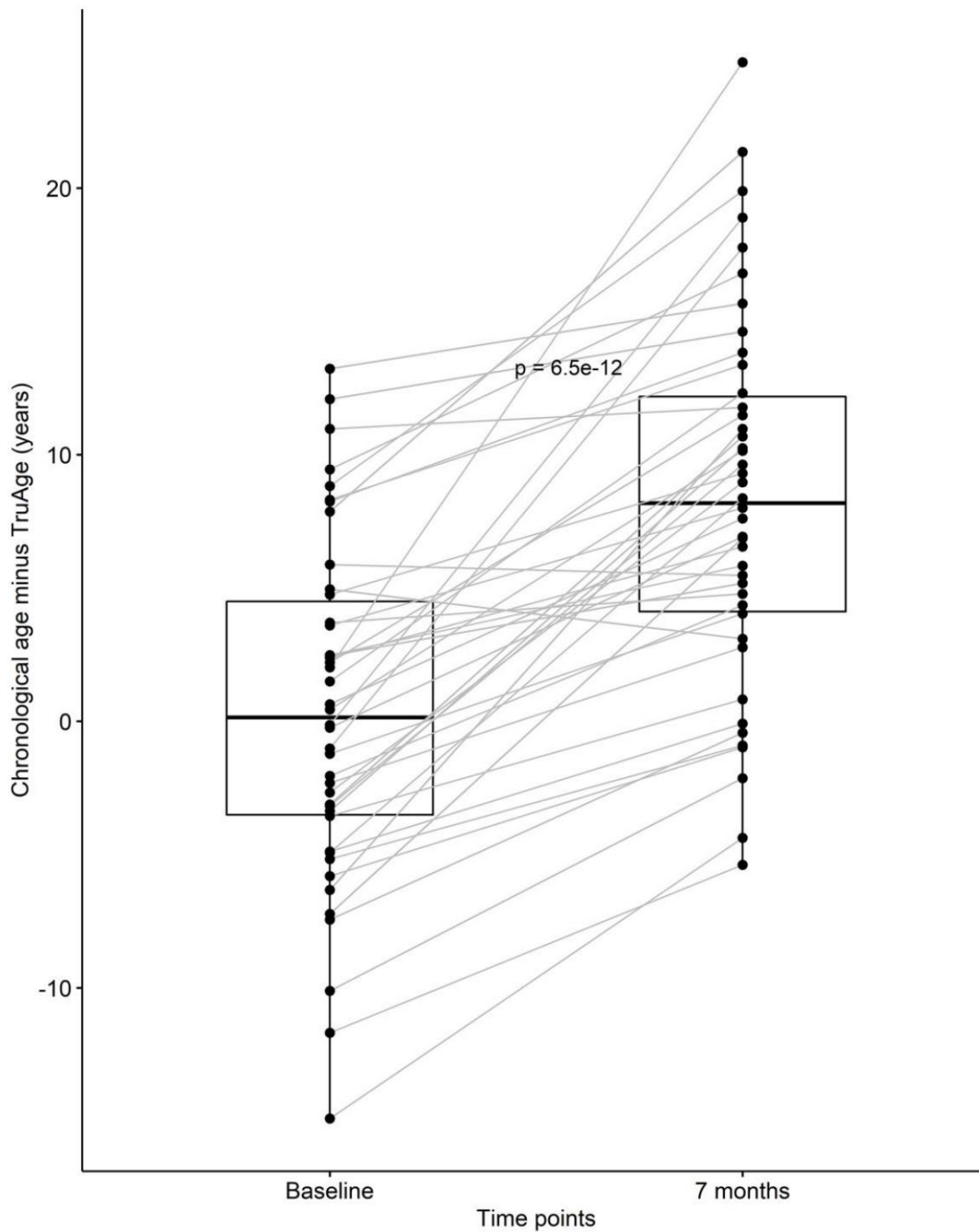


Figura 4. CaAKG disminuyó la edad de metilación en toda la cohorte. Los diagramas de caja emparejados representan los efectos del tratamiento a nivel de paciente y grupo (n=42), entre el inicio y el final del ensayo (que en promedio tuvo una duración de 7 meses). Los diagramas de caja representan la mediana y los cuartiles 25 y 75 .

y/o las personas con una edad cronológica inicial alta tienen la mayor respuesta a Rejuvant®.

Usando el modelo reducido final, con solo las dos variables encontradas estadísticamente significativamente relacionadas con una disminución en la edad epigenética durante el transcurso del tratamiento, la diferencia de edad epigenética (en años) de aproximadamente 7 meses de suplementación con CaAKG puede ser modelada por el ecuación:

$$\text{Disminución de la edad real} = -5.41 \text{ edad} - 0.45 \text{ diferenciaEdad}$$

donde "edad" representa la edad cronológica al comienzo del tratamiento y "diffAge" se define como la diferencia entre la edad cronológica y la edad TruMe al inicio.

El plano que representa esta regresión se muestra (Figura 6).

Curiosamente, la duración del tratamiento no se correlaciona con la magnitud del efecto de la suplementación con Rejuvant®. Esto indica que la mediana de duración del tratamiento de nuestra cohorte, aproximadamente 7 meses, puede ser suficiente para saturar los beneficios de la suplementación.

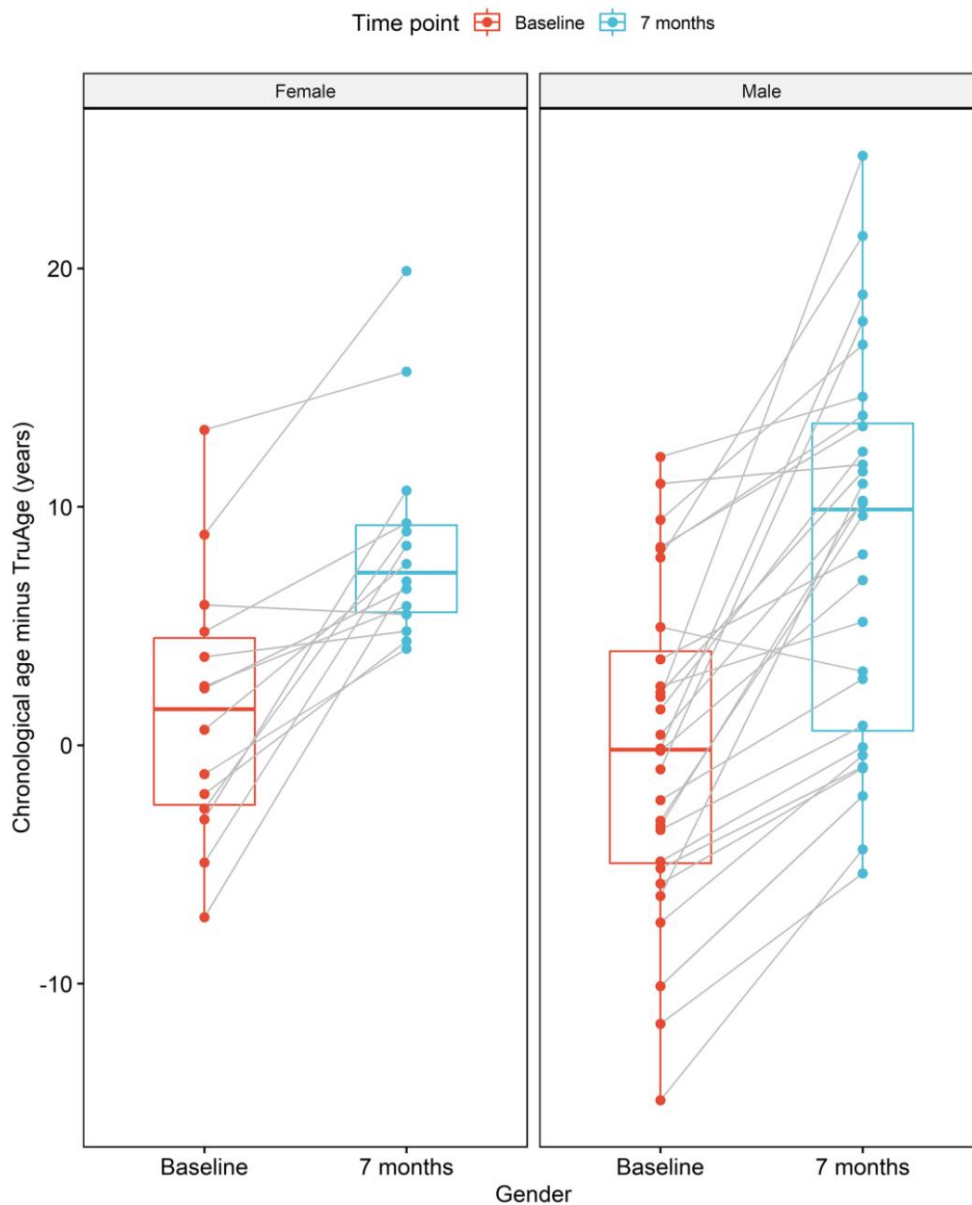


Figura 5. CaAKG disminuye la edad de metilación independientemente del sexo. La imagen muestra los efectos de CaAKG en la edad de metilación entre el inicio y el final del tratamiento, desglosados por género. Para cada género, los diagramas de caja emparejados rojos y azules representan los datos al inicio y al final, respectivamente. Los diagramas de caja se basan en la mediana y los cuartiles 25 y 75 .



Curiosamente, este hallazgo es consistente con las extrapolaciones matemáticas de un estudio a gran escala de mediciones de hemogramas completos, que pronostican que los efectos de una intervención de longevidad en una población sana se saturarán en un corto periodo de tiempo [30]. Este mismo estudio predijo que los beneficios de tales intervenciones serían mayores en individuos más cercanos a un estado frágil, de acuerdo con nuestros datos.

Habiendo dicho esto, quedan muy pocos datos sobre el uso a largo plazo de Rejuvant® o dosis más altas del producto, y son factibles otros efectos sobre la edad biológica. Tampoco medimos si los beneficios en la edad biológica se pierden si se suspende el suplemento, por lo tanto, es posible que se necesite una suplementación continua para mantener los efectos observados.

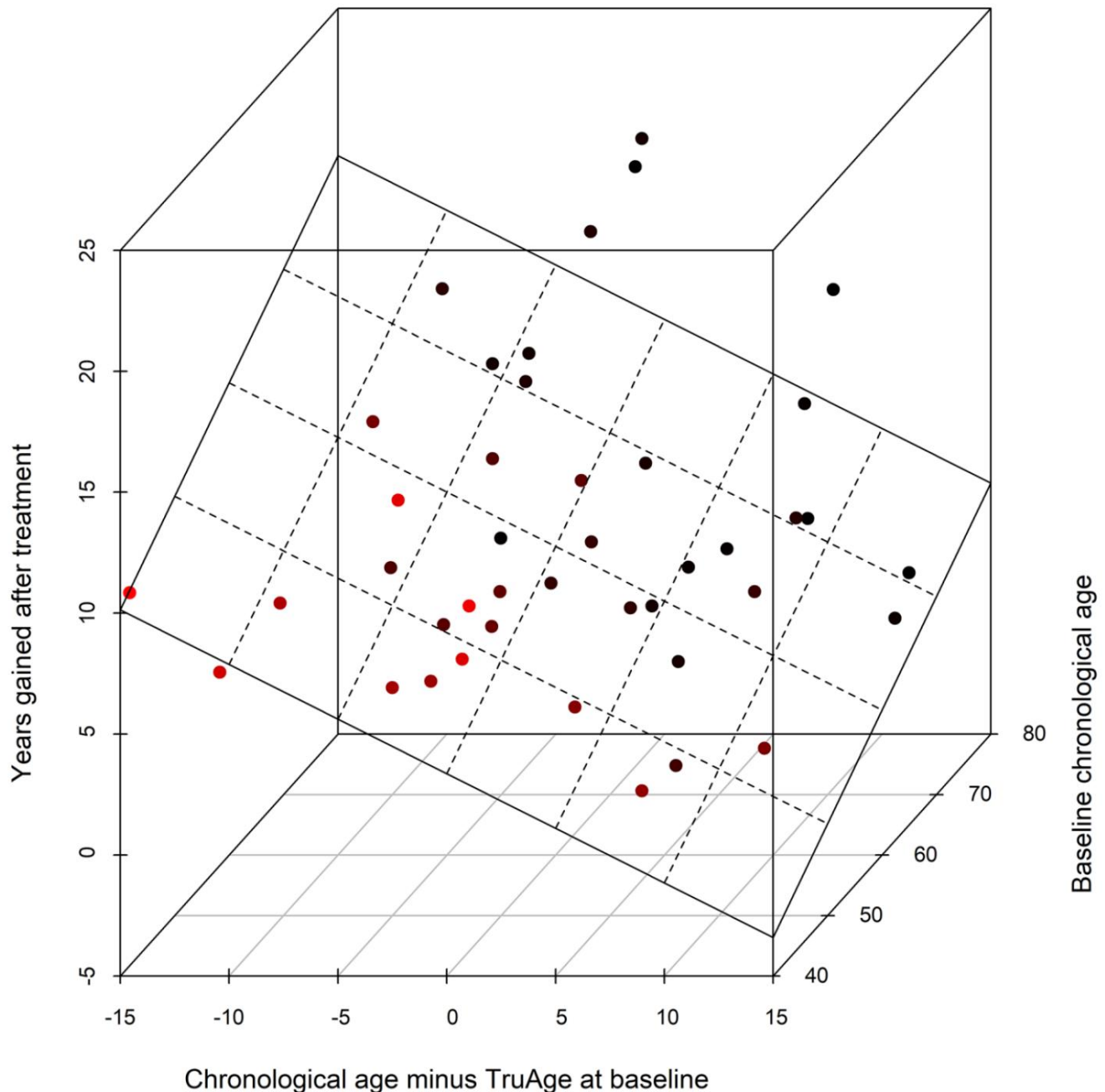


Figura 6. Diagrama de dispersión 3D de las covariables que influyen en la eficacia del tratamiento con CaAKG. El eje x se refiere a la diferencia, en años, entre las edades cronológica y biológica al inicio del estudio (un paciente en un estado de mayor edad tendrá un valor positivo mayor). El eje y representa el efecto del tratamiento con CaAKG en términos de años en que disminuyó la edad de metilación (los valores más altos indican mayores beneficios). El eje z es la edad cronológica al inicio del estudio (los pacientes mayores serán "más profundos"). El plano 3D se trazó usando la regresión lineal de ambas covariables al efecto del tratamiento.

## DISCUSIÓN

Se ha demostrado que AKG prolonga la vida útil en varios sistemas modelo. En este estudio, utilizamos un algoritmo desarrollado previamente que predice la edad biológica humana para determinar si Rejuvant®, CaAKG + vitaminas de liberación sostenida tiene un efecto beneficioso sobre la longevidad humana. Se seleccionó un total de 42 personas, que se sabía que tomaban Rejuvant® y que habían enviado muestras de saliva para la prueba de metilación del ADN, para participar en una encuesta y análisis de resultados de envejecimiento biológico de clientes.

Su índice DNAm TruAge se midió al inicio (antes de comenzar con Rejuvant®) y se volvió a analizar después de un promedio de 7 meses de uso. En general, estos 42 individuos mostraron una reducción promedio estadísticamente significativa en su edad biológica de aproximadamente 8 años.

El pensamiento general en el campo de la investigación sobre el envejecimiento es que es probable que las intervenciones afecten a subconjuntos de la población, y ninguna intervención (estilo de vida o molécula pequeña) retrasará o reducirá la edad biológica en toda la población. Sorprendentemente, en este grupo, la gran mayoría de los participantes respondieron con una edad biológica reducida después del tratamiento con Rejuvant®. Si bien el estudio tiene limitaciones (descritas a continuación), estos hallazgos son alentadores. Curiosamente, hubo dos parámetros que influyeron en la magnitud de la respuesta: aquellos participantes con mayor edad biológica en relación con la edad cronológica y aquellos con mayor edad cronológica al inicio del estudio. Esto sugiere, tal vez contrario a las expectativas dado el papel conocido de AKG en el aumento del rendimiento del ejercicio, que Rejuvant® tiene una mayor respuesta en los participantes biológicamente mayores que su edad cronológica. También se podría predecir este resultado para una intervención de longevidad sobre la base de la hipótesis de que los individuos con una edad biológica relativa baja ya están experimentando un envejecimiento casi optimizado y tienen menos que ganar. Actualmente, no hay datos suficientes sobre el envejecimiento humano para predecir qué poblaciones responderán a una intervención en particular.

La prueba de metilación TruAge, que sigue siendo patentada, se desarrolló examinando un número limitado de sitios de metilación en islas CpG de promotores, en función de la optimización a la edad cronológica utilizando un enfoque de aprendizaje automático. Si bien examina una porción más pequeña del genoma que otros relojes de metilación, tiene la ventaja de ser más asequible. Además, la prueba TruAge es fácilmente utilizada por los consumidores, que colocan la saliva en una tarjeta de papel y envían la muestra por correo para su análisis. Se demostró que la prueba TruAge informa resultados similares en comparación con otros relojes epigenéticos (no publicado), pero sería beneficioso realizar más pruebas con otros relojes de metilación y diferentes biomarcadores del envejecimiento para medir los efectos de Rejuvant®.

sobre la longevidad humana. Una pregunta fundamental con respecto a las diferentes medidas biológicas del envejecimiento se relaciona con su nivel de concordancia: ¿miden aspectos iguales, superpuestos o completamente diferentes del proceso de envejecimiento?

Los datos de este estudio, si bien son limitados, sugieren que CaAKG puede afectar el envejecimiento, al menos según lo medido por la metilación. También vale la pena señalar que AKG es un sustrato conocido para las desmetilasas de ADN [31], que potencialmente desmetilan los sitios de ADN interrogados por TruAge. Sin embargo, la suplementación con AKG conduce tanto a la desmetilación como a la hipermetilación de algunos sitios CpG en las células de la saliva, lo que sugiere que Rejuvant® puede tener un efecto mayor en los relojes de envejecimiento basados en la metilación que otros indicadores de la edad biológica.

Existen varias limitaciones en este estudio. Principalmente, no está controlado con placebo. Por lo tanto, una preocupación potencial es que el efecto placebo puede haber contribuido en cierta medida a los cambios observados. Sin embargo, la confianza autoinformada en la eficacia de los suplementos dietéticos no se consideró un predictor estadísticamente significativo en ninguno de nuestros modelos de regresión, lo que mitiga el riesgo hasta cierto punto. Además, el estudio describe un tamaño de muestra limitado y no pudimos recopilar otros tipos de datos relevantes para el envejecimiento, por ejemplo, marcadores clínicos de envejecimiento y enfermedad, y aplicar otros relojes biológicos de envejecimiento [6]. Se requerirán futuros ensayos clínicos aleatorios para confirmar los hallazgos presentados aquí. Sin embargo, los resultados de este manuscrito sugieren que Rejuvant® puede tener efectos significativos sobre la edad biológica medida por la metilación del ADN de las muestras de saliva.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Participantes

Un grupo de 42 individuos sanos autoinformados (14 mujeres y 28 hombres) que habían enviado muestras de saliva (dos muestras por sujeto). Se recolectaron muestras de saliva al inicio (T0) y 4 a 10 meses después de que el participante comenzara a tomar Rejuvant® (T7) en una dosis fija de dos tabletas por día. Cada dosis contenía 1 gramo de alfa-cetoglutarato de calcio, junto con vitamina A para la formulación del participante masculino o vitamina D para la formulación de la participante femenina, y se entregaba en una formulación de liberación prolongada, como se ilustra en las etiquetas de la formulación.

TruMe identificó a los posibles participantes del estudio de todos los clientes con dos pruebas de ADNm completadas previamente (una de referencia antes de comenzar y una segunda prueba de 4 a 10 meses después de la suplementación con Rejuvant(R)). Los posibles sujetos recibieron su consentimiento y se les pidió que completaran un cuestionario que informaba sobre los cambios en el estilo de vida antes y después de la suplementación en dieta, ejercicio, sueño, alcohol

consumo, tabaquismo y uso de suplementos nutricionales.

El formulario de consentimiento incluía la siguiente declaración: "A TruMe le gustaría tener su permiso para usar los resultados de su edad biológica con fines científicos y académicos. Siempre será anónimo y nunca se compartirá ninguna información de identificación personal.

TruMe no utiliza la secuenciación completa del genoma y, por lo tanto, no genera ni mantiene ningún dato identificable genéticamente. Nunca vendemos sus datos o información personal". Se incluyeron en el estudio los participantes que proporcionaron el consentimiento apropiado siguiendo los principios de GCP. El análisis de los datos de los participantes se realizó de forma agregada y anónima (Tabla 1).

Vitamina A (como palmitato de retinilo) 900 mcg 100%	
Calcio 190mg 15%	
Alfa-cetoglutarato de calcio Monohidrato (LifeAKG™)	1000 miligramos †
Vitamina D	25
Calcio	microgramos 190 mg
Alfa-cetoglutarato de calcio Monohidrato (LifeAKG™)	1000 miligramos

#### Recolección de muestras y secuenciación de bisulfato

Las muestras de saliva fueron recolectadas por los propios participantes en sus hogares utilizando kits de muestreo TruMe disponibles en el mercado. Se indicó a los participantes que recogieran entre 200 y 300 ml de sus muestras de saliva en tarjetas FTA Classic (tarjetas FTA Classic, n.º WB120205, de GE Healthcare Life Sciences). Las muestras de saliva se dejaron secar al aire durante 30 a 45 minutos antes de enviarlas a TruMe Labs.

#### Metilación del ADN y cálculo de la edad del ADN

De cada muestra, se obtuvieron círculos de 1 pulgada de diámetro y el ADN se eluyó con el kit Quick-DNA Microprep Plus (ZymoResearch, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. 200-500 ng de ADN eluido se convirtieron con bisulfito con el kit EZ DNA Methylation Lighting™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ZymoResearch, CA, EE. UU.). La amplificación por PCR del ADN convertido con bisulfito se realizó utilizando cebadores específicos de diana estándar (IDT, Newark, NJ, EE. UU.). La reacción de PCR se configuró utilizando ZymoTaq PreMix E2004 (ZymoResearch, CA, EE. UU.).

Cada fragmento de PCR se analizó mediante el protocolo estándar de secuenciación de Sanger y los niveles de metilación se analizaron mediante un algoritmo patentado, desarrollado por TruMe Inc. El algoritmo de predicción de la edad de TruMe utiliza un

modelo multivariado para predecir la edad biológica del individuo.

#### análisis estadístico

Los datos se analizaron y los gráficos se generaron utilizando el lenguaje de programación R. Las variables continuas se sometieron a prueba de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. En los casos en los que no logramos rechazar la hipótesis nula (valor de p no inferior a 0,05), se utilizó la prueba t pareada de dos muestras de Welch unilateral; de lo contrario, se implementó la prueba t pareada de rango con signo de Wilcoxon unilateral con corrección de continuidad [32]. Las figuras 1 a 5 se realizaron con el paquete R 'ggpubr'. La figura 6 se creó utilizando el paquete R 'scatterplot3d' [33].

#### CONTRIBUCIONES DE AUTOR

OD ayudó con el establecimiento de la prueba TruMe Age y fue responsable de los experimentos relacionados con su uso. DB realizó el análisis estadístico de los datos y participó en la redacción del manuscrito. VB asistido con el análisis estadístico de los datos. RF ayudó con el control y análisis de la calidad de los datos, así como con la composición del manuscrito. FRP participó en el diseño del estudio, la composición del manuscrito y el análisis de datos. BKK participó en el diseño del estudio, la composición del manuscrito y el análisis de datos. YVB participó en el establecimiento de la prueba TruMe Age, el diseño del estudio, la composición del manuscrito y el análisis de datos.

#### EXPRESIONES DE GRATITUD

Los autores desean agradecer a los miembros del laboratorio Kennedy en NUS, así como a los empleados de TruMe Labs y PDL Health por sus comentarios sobre el manuscrito.

#### CONFLICTOS DE INTERÉS

En julio de 2019, TruMe celebró un acuerdo de servicio al cliente no exclusivo para la prueba de metilación del ADN de los clientes de Ponce de Leon Health que toman Rejuvant®. Ni TruMe ni Ponce de Leon Health tienen propiedad cruzada u otros intereses financieros que informar. BKK es consultor científico y miembro de la junta de Ponce de Leon Health.

#### FONDOS

Los datos para el manuscrito se obtuvieron de los usuarios del producto Rejuvant de Ponce de Leon Health y del análisis de metilación del ADN proporcionado por TruMe Labs. Los datos se proporcionaron a la Universidad Nacional de Singapur para el análisis estadístico, que brindó apoyo financiero para este componente del proyecto.

## REFERENCIAS

1. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, et al.  
Gerociencia: vinculando el envejecimiento a las enfermedades crónicas. *Celula*. 2014; 159:709–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.039> PMID:25417146

---

2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Las señas de identidad del envejecimiento. *Celula*. 2013; 153:1194–217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039> PMID:23746838

---

3. Kennedy BK, Pennypacker JK. Medicamentos que modulan el envejecimiento: el camino prometedor pero difícil por delante. *Transl Res*. 2014; 163:456–65. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.007> PMID:24316383

---

4. Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B.  
Biomarcadores del envejecimiento: de la función a la biología molecular. *Nutrientes*. 2016; 8:338. <https://doi.org/10.3390/nu8060338> PMID:27271660

---

5. Juez JN, Ferrucci L, Newman AB, Aroda VR, Bahnson JL, Divers J, Espeland MA, Marcovina S, Pollak MN, Kritchevsky SB, Barzilai N, Kuchel GA. Un marco para la selección de biomarcadores basados en sangre para ensayos clínicos guiados por gerociencia: informe del Grupo de trabajo de biomarcadores de TAME. *Gerociencia*. 2018; 40:419–36. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0042-y> PMID:30151729

---

6. Kudryashova KS, Burka K, Kulaga AY, Vorobyeva NS, Kennedy BK.  
Biomarcadores del envejecimiento: de las pruebas funcionales a los enfoques multiómicos. *Proteómica*. 2020; 20:e1900408. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900408> PMID:32084299

---

7. Cavalli G, Heard E. Los avances en epigenética vinculan la genética con el medio ambiente y la enfermedad. *Naturaleza*. 2019; 571:489–99. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0> PMID:31341302

---

8. Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, Wren JD, Porter H, Richardson A. El papel de la metilación del ADN en la epigenética del envejecimiento. *Pharmacol Ther*. 2019; 195:172–85. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.001> PMID:30419258

---

9. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, et al.  
En todo el genoma los perfiles de metilación revelan vistas cuantitativas de las tasas de envejecimiento humano. *Célula Mol*. 2013; 49:359–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016> PMID:23177740

---

10. Jin B, Li Y, Robertson KD. Metilación del ADN: ¿superior o subordinado en la jerarquía epigenética? *Genes Cáncer*. 2011; 2:607–17. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957> PMID:21941617

---

11. Teschendorff AE, West J, Beck S. Deriva epigenética asociada a la edad: ¿implicaciones y un caso de economía epigenética? *Hum Mol Genet*. 2013; 22:R7–15. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt375> PMID:23918660

---

12. Horvath S. Edad de metilación del ADN de tejidos humanos y tipos de células. *Genoma Biol*. 2013; 14:R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115> PMID:24138928

---

13. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. Epigenetic predictor of age. *Más uno*. 2011; 6:e14821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014821> PMID:21731603

---

14. Breitling LP, Saum KU, Perna L, Schöttker B, Holleczer B, Brenner H. La fragilidad está asociada con el reloj epigenético pero no con la longitud de los telómeros en una cohorte alemana. *Clin Epigenética*. 2016; 8:21. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0186-5> PMID:26925173

---

15. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Ritchie SJ, Muniz Terrera G, Harris SE, Gibson J, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Taylor A, Murphy L, et al. El reloj epigenético se correlaciona con la aptitud física y cognitiva en la cohorte de nacimiento de Lothian de 1936. *Int J Epidemiol*. 2015; 44:1388–96. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu277> PMID:25617346

---

16. Horvath S, Erhart W, Brosch M, Ammerpohl O, von Schönfels W, Ahrens M, Heits N, Bell JT, Tsai PC, Spector TD, Deloukas P, Siebert R, Sipos B, et al.  
La obesidad acelera el envejecimiento epigenético del hígado humano. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111:15538–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412759111> PMID:25313081

---

17. Horvath S, Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Salvioli S, Gentilini D, Di Blasio AM, Giuliani C, Tung S, Vinters HV, Franceschi C. Envejecimiento epigenético acelerado en el síndrome de Down. *Célula de envejecimiento*. 2015; 14:491–95. <https://doi.org/10.1111/accel.12325> PMID:25678027

---

18. Lagathu C, Cossarizza A, Bérézat V, Nasi M, Capeau J, Pinti M. Ciencia básica y patogénesis del envejecimiento con VIH: mecanismos potenciales y biomarcadores. *SIDA*. 2017 (Suplemento 2); 31:S105–19.

- <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001441>  
PMID:28471941
19. Horvath S, Ritz BR. Aumento de la edad epigenética y del recuento de granulocitos en la sangre de pacientes con enfermedad de Parkinson. *Envejecimiento* (Albany NY). 2015; 7:1130–42. <https://doi.org/10.18632/aging.100859> PMID:26655927
20. Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S. La edad epigenética de la corteza prefrontal se asocia con placas neuríticas, carga amiloide y funcionamiento cognitivo relacionado con la enfermedad de Alzheimer. *Envejecimiento* (Albany NY). 2015; 7:1198–211. <https://doi.org/10.18632/envejecimiento.100864> PMID:26684672
21. Ambatipudi S, Horvath S, Perrier F, Cuenin C, Hernandez-Vargas H, Le Calvez-Kelm F, Durand G, Byrnes G, Ferrari P, Bouaoun L, Sklias A, Chajes V, Overvad K, et al. El análisis del metiloma del ADN identifica el envejecimiento epigenético acelerado asociado con la susceptibilidad al cáncer de mama posmenopáusico. *Eur J Cáncer*. 2017; 75:299–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.014> PMID:28259012
22. Zannas AS, Arloth J, Carrillo-Roa T, Iurato S, Röh S, Ressler KJ, Nemeroff CB, Smith AK, Bradley B, Heim C, Menke A, Lange JF, Brückl T, et al. El estrés de por vida acelera el envejecimiento epigenético en una cohorte afroamericana urbana: relevancia de la señalización de glucocorticoides. *Genoma Biol*. 2015; 16:266. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0828-5> PMID:26673150
23. Asadi Shahmirzadi A, Edgar D, Liao CY, Hsu YM, Lucanic M, Asadi Shahmirzadi A, Wiley CD, Gan G, Kim DE, Kasler HG, Kuehnemann C, Kaplowitz B, Bhaumik D, et al. El alfa-cetoglutarato, un metabolito endógeno, prolonga la vida útil y comprime la morbilidad en ratones envejecidos. *Metab. celular* 2020; 32:447–56.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.004> PMID:32877690
24. Xiao D, Zeng L, Yao K, Kong X, Wu G, Yin Y. El metabolismo de la glutamina-alfa-cetoglutarato (AKG) y sus implicaciones nutricionales. *Aminoácidos*. 2016; 48:2067–80. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2254-8> PMID:27161106
25. Wu N, Yang M, Gaur U, Xu H, Yao Y, Li D. Alfa cetoglutarato: aplicaciones fisiológicas y nutricionales. *Biomol Ther* (Seúl). 2016; <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.078> PMID:26759695
26. Zdzisińska B, Żurek A, Kandefler-Szerszeń M. Alfa cetoglutarato como molécula con actividad pleiotrópica: posibilidades conocidas y novedosas de uso terapéutico. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017; 65:21–36. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0406-x> PMID:27326424
27. Harrison AP, Pierzynowski SG. Efectos biológicos del 2-oxoglutarato con especial énfasis en la regulación de la absorción/metabolismo de proteínas, minerales y vitaminas, en relación con el envejecimiento desde una perspectiva de envejecimiento saludable: artículo de revisión de última generación. *J Physiol Pharmacol*. 2008 (Suplemento 1); 59:91–106. PMID:18802218
28. Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, Deng G, Diep S, Lomenick B, Meli VS, Monsalve GC, Hu E, Whelan SA, Wang JX, et al. El metabolito  $\alpha$  cetoglutarato prolonga la vida al inhibir la ATP sintasa y TOR. *Naturaleza*. 2014; 510:397–401. <https://doi.org/10.1038/nature13264> PMID:24828042
29. Liao CY, Kennedy BK. Modelos de ratón y envejecimiento: longevidad y progeria. *Curr Top Dev Biol*. 2014; 109:249–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397920-9.00003-2> PMID:24947239
30. Pyrkov TV, Avchaciov K, Tarkhov AE, Menshikov LI, Gudkov AV, Fedichev PO. El análisis longitudinal de los marcadores sanguíneos revela una pérdida progresiva de resiliencia y predice el límite de vida humana. *Nat Comun*. 2021; 12:2765. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23014-1> PMID:34035236
31. Salminen A, Kauppinen A, Hiltunen M, Kaarniranta K. Los intermedios del ciclo de Krebs regulan la metilación del ADN y las histonas: impacto epigenético en el proceso de envejecimiento. *Envejecimiento Res Rev*. 2014; 16:45–65. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.05.004> PMID:24910305
32. Parque Nacional Runyon. Estadística no paramétrica: un enfoque contemporáneo. Addison-Wesley Publishing Company. 1977.
33. Ligges U, Maechler M. scatterplot3d: un paquete R para visualizar datos multivariados. *Software J Stat*. 2003; 8:1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v008.i11>

## MATERIALES COMPLEMENTARIOS

## Tablas Suplementarias

Explore la versión de texto completo para ver los datos de la Tabla complementaria 2.

Tabla complementaria 1. Características de los participantes al inicio del estudio.

	Femenino	Masculino
	14	28
Etnicidad (%)		
asiático	1 (7,1)	1 (3,6)
Hispano / latino	(7,1) 12	(3,6) 23
Blanco/Caucásico	(85,7) 0	(82,1) 2 (7,1)
Blanco/caucásico, indio americano o nativo de Alaska	(0,0) 0	1 (3,6)
Blanco/caucásico, nativo de Hawái u otro isleño del Pacífico	(0,0) 62,57	61,16
Edad cronológica T0 (media (DE))	(8,11) 63,12	(11,03) 61,76
Edad cronológica T7* (media (DE))	(8,11) 61,09	(11,01) 61,38
Edad biológica T0 (media (DE))	(7,27) 54,66	(9,64) 53,53
Edad biológica T7* (media (DE))	(8,17)	(8,62)
Consumo semanal de alcohol en bebidas (%)		
0	5 (35,7)	5 (17,9)
1 a 4	(14,3) 6	(35,7) 8
5 a 8	(42,9) 1	(28,6) 5
9 a 14	(7,1)	(17,9)
Número actual de suplementos dietéticos (%)		
0	2 (14,3)	4 (14,3)
1 a 2	(28,6) 5	(10,7) 6
3 a 4	(35,7) 3	(21,4) 15
5	(21,4)	(53,6)
Salud general autoevaluada (%)		
Moderado	1 (7,1)	1 (3,6)
Bien	(50,0) 6	(32,1) 18
Muy bien	(42,9)	(64,3)
Duración del sueño (%)		
4-6 horas	1 (7,1)	2 (7,1)
7-8 horas	13 (92,9)	24 (85,7)
Más de 8 horas	(0,0)	(7,1)
Historia de tabaquismo (%)		
Ex fumador pero dejó de fumar nunca fumador	3 (21,4)	3 (10,7)
Frecuencia de ejercicio semanal (%)		
Raramente	1 (7,1)	0 (0,0)
1-2 veces por semana	(0,0) 7	(17,9) 17
3+ veces/semana	(50,0) 6	(60,7) 6
A diario	(42,9)	(21,4) 25,70
IMC (media (DE))	21,84 (2,60)	(3,97) 218,36
Días de tratamiento (media (DE))	200,57 (35,78)	(41,57)
Educación (%)		
Diploma de escuela secundaria (o GED)	1 (7,1)	0 (0,0)
Algo de universidad	(21,4) 2	(14,3) 10
Título universitario de 4 años	(14,3) 8	(35,7) 14
título de posgrado	(57,1)	(50,0)
Número promedio de comidas diarias (%)		
2	6 (42,9)	11 (39,3)

3	7 (50,0)	14 (50,0) 3
4 o más	1 (7,1)	(10,7)
Número de meriendas diarias (%)		
1	6 (42,9)	18 (64,3) 8
2	6 (42,9)	(28,6) 2
3	2 (14,3)	(7,1)
Opinión sobre suplementos dietéticos (%)		
Escéptico	2 (14,3)	3 (10,7) 0
Sin opinión	2 (14,3)	(0,0) 4
Interesado	6 (42,9)	(14,3) 21
Firme creyente	4 (28,6)	(75,0)
Frecuencia semanal de suplementos dietéticos (%)		
Nunca	1 (7,1)	0 (0,0) 1
Casi nunca	0 (0,0)	(3,6) 27
A diario	13 (92,9)	(96,4)
Mentalidad de vida saludable (%)		
Listo para comenzar	1 (7,1)	1 (3,6)
Practicando	10 (71,4)	15 (53,6)
Dedicado	3 (21,4)	12 (42,9)
Nivel de actividad (%)		
Sedentario	1 (7,1)	2 (7,1) 5
Ligeramente activo	2 (14,3)	(17,9) 12
Activo	5 (35,7)	(42,9) 9
Muy activo	6 (42,9)	(32,1) 0
Atlético	0 (0,0)	(0,0)
Cabello (%)		
Calvo	0 (0,0) 5	4 (14,3)
Adelgazamiento	(35,7) 9	11 (39,3)
Grueso y/o Completo	(64,3)	13 (46,4)

\*Indica la edad biológica medida por la prueba TruMe después de un promedio de siete meses de tratamiento.

Tabla complementaria 2. Modelos de regresión utilizados (con coeficientes).