

**TÍTULO DEL PROYECTO (ACRÓNIMO): ENvejecimiento SA ludable a través de una alimentación restringida en el Tiempo en adultos con sobrepeso/obesidad y enfermedad hepática incipiente: el estudio ENSATI.**

**TITLE OF THE PROJECT (ACRONYM): Healthy aging through time- restricted eating in adults with overweight/obesity and incipient liver disease: the ENSATI study.**

<b>Promotor:</b>	IMDEA-ALIMENTACION, Grupo de Control Nutricional del Epigenoma
<b>Investigador Principal</b>	Lidia Daimiel Ruiz
<b>Otros Investigadores</b>	<u>IMDEA Alimentación</u> : José M <sup>a</sup> Ordovás, Celia Martínez-Pérez, Juana Esther Cuadrado Soto, Cristina Climent Mainar <u>Clínica Universidad de Navarra</u> : Diego Martínez Urbistondo, Ana Huerta González
<b>Centros</b>	1. IMDEA Alimentación 2. Clínica Universidad de Navarra

## ENMIENDAS AL PROTOCOLO

Fecha	Valor afectado	Descripción	Justificación	versión que genera
05/11/2023	Esquema de recogida de datos	Se decide eliminar la analítica y recogida de muestras de la visita de 3 meses, así como la realización de las técnicas de elastografía hepática, densitometría ósea y calorimetría indirecta de dicha visita.	El objetivo es disminuir el nº de visitas a las que debe acudir el participante con el fin de mejorar su compromiso en el seguimiento de la intervención y reducir los abandonos.	1.2
29/11/2023	Criterios de inclusión	Ampliación del rango de edad. Nuevo rango de edad: 50-70 años	El inicio del reclutamiento ha mostrado el potencial de reclutamiento en la población de 50 a 55 años cuyos factores de riesgo no difieren de los adultos, hombres y mujeres de 55 años. Esta modificación permitirá mejorar la tasa de reclutamiento.	2.0
29/11/2023	Criterios de inclusión	Ampliación del rango de IMC. Nuevo rango propuesto: 27-40 Kg/m <sup>2</sup>	El inicio del reclutamiento ha mostrado el interés de población de 35 a 40 Kg/m <sup>2</sup> de IMC por participar en el estudio. Esta modificación permitirá mejorar la tasa de reclutamiento.	2.0
29/11/2023	Criterios de inclusión	Reducción del umbral de FLI. Nuevo umbral = 30	El valor de FLI mayor de 30 indica un probable desarrollo o presencia de hígado graso que requiere de verificación adicional mediante otros métodos diagnósticos. Si bien, el grado de seguridad de la presencia de hígado graso con el umbral de	2.0

			59 es mayor, este criterio de inclusión afecta de forma importante al reclutamiento de voluntarios. Dado que la evolución de la funcionalidad hepática no es un objetivo primario del estudio, se decide aumentar la flexibilidad de este criterio rebajando el umbral	
14/12/2023	Criterios de inclusión	Ampliación del rango de IMC. Nuevo rango propuesto: 27-40 Kg/m <sup>2</sup>	El inicio del reclutamiento ha mostrado el interés de población de 35 a 40 Kg/m <sup>2</sup> de IMC por participar en el estudio. Esta modificación permitirá mejorar la tasa de reclutamiento.	2.1 14/12/2023
16/01/2024	Criterios de inclusión	Ampliación del rango de IMC. Nuevo rango propuesto: 27-40 Kg/m <sup>2</sup>		2.2 16/01/2024
16/01/2024	Criterios de inclusión	Se permite la inclusión de participantes que reportan una ventana de alimentación de, al menos 12	Esta decisión obedece a que el equipo de trabajo observa que los voluntarios son poco precisos en las preguntas acerca del horario en el que realizan las diferentes comidas del día, asumiéndose, por tanto que puede existir una desviación de +2h entre el horario reportado y el horario real.	2.2 16/01/2024
06/03/2024	Inclusión de nuevas determinaciones	Se incluyen las determinaciones de densitometría, elastografía y	Esta decisión obedece a la disponibilidad de los equipos, a la sencillez de las pruebas y a la no	3 06/03/2024

		calorimetría indirecta en el momento basal, tras la intervención (V_06) y al finalizar el estudio (V_12)	invasibilidad de las mismas.	
06/03/2024	Cambio de equipo de medición	<p>Se sustituye el uso del Actigraph GTX3 por el FitBit Versa 3 y se amplía el periodo de toma de mediciones a 14 días.</p>	<p>Se decide modificar el equipo de determinación de la actividad física por el mayor número de variables recogidas por el equipo Fitbit Versa 3.</p> <p>Se amplía el periodo de mediciones a 14 días para hacerlo coincidir con el periodo de toma de mediciones del sensor de glucosa.</p>	3 06/03/2024

## RESÚMEN

El proceso de envejecimiento está asociado a un deterioro funcional a lo largo del tiempo que transcurre con gran variabilidad entre personas. El envejecimiento saludable se refiere al mantenimiento de habilidades funcionales, tanto fisiológicas como motoras y psicológicas que resultan en el mantenimiento del bienestar del individuo en la ancianidad. Promover estrategias de envejecimiento saludable tendría un impacto importante a nivel social y económico, considerando que actualmente el envejecimiento es un factor de riesgo para múltiples enfermedades y que la proporción de personas ancianas en la población sigue aumentando. Hábitos de vida saludables como una nutrición adecuada podrían mejorar la calidad del envejecimiento. Entre las intervenciones en el estilo de vida que podrían contribuir a esa mejor calidad, la alimentación restringida en el tiempo (ART) está emergiendo como candidata prometedora. La ART es un tipo de ayuno intermitente que implica un consumo de alimentos limitado a un periodo de tiempo y que podría tener un efecto positivo en algunos aspectos de la salud como han mostrado tanto estudios preclínicos como ensayos clínicos. Los efectos beneficiosos de la ART pueden ocurrir a diferentes niveles fisiológicos relacionados con un envejecimiento saludable, tales como el metabolismo y la composición corporal, los ritmos circadianos y el sueño, y la función cognitiva. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales la ART influye estos aspectos no se comprenden en profundidad. La ART puede modular procesos fisiológicos que contribuyen al envejecimiento. A nivel celular y molecular, la pérdida de homeostasis de proteínas, alteraciones epigenéticas y la senescencia celular se han propuesto como sellos de identidad del envejecimiento. La autofagia es uno de los principales sistemas proteolíticos implicados en el control de calidad de las proteínas y esta actividad crucial para la homeostasis celular se reduce con la edad. Por lo tanto, los efectos de la ART en los diferentes aspectos del envejecimiento pueden estar mediados por procesos autofágicos. Con respecto a la epigenética, variaciones en la edad biológica determinada por marcadores de metilación también pueden verse influenciadas por la ART. Finalmente, la ART podría tener un impacto en el envejecimiento a través de una mejora en la inmunosenescencia del organismo. Por lo tanto, considerando la evidencia actual la hipótesis de este proyecto es que una intervención con ART en individuos con sobrepeso/obesidad tiene un efecto positivo en los determinantes de su envejecimiento (metabolismo y composición corporal, ritmos circadianos y sueño, calidad de vida y función cognitiva) lo cual se asocia con cambios favorables en rasgos celulares del envejecimiento (autofagia, inmunosenescencia y edad biológica). Los resultados de este estudio contribuirán a determinar si la ART es una estrategia eficiente para reducir el riesgo del sobrepeso y el síndrome metabólico. Además, aportará conocimiento a nivel de mecanismos de los efectos de la ART en aspectos fisiológicos que pueden influenciar los rasgos celulares del envejecimiento. Estos datos serán útiles desde una perspectiva clínica para manejar a sujetos con obesidad y síndrome metabólico, y ahorrar costes derivados de su tratamiento, así como contribuir a un envejecimiento saludable. En general, la información derivada de este proyecto será relevante para elaborar políticas orientadas a guiar hábitos dietéticos en la población y reducir el impacto de enfermedades no transmisibles asociadas con el envejecimiento.

## SUMMARY

Aging has been defined as the time-dependent functional decline that affects most living organisms, and this biological process occurs with great variability from person to person. Healthy aging refers to developing and maintaining functional abilities to enable the well-being of the elderly. Therefore, promoting healthy aging strategies in the population would result in people living in a healthy state for most of their lifespan. This would have an important socio-economic impact, considering that aging is a risk factor for multiple diseases and that the proportion of older persons continues to increase. Interestingly, healthy lifestyle habits such as proper nutrition and physical exercise could attenuate the progression of aging-related diseases and ameliorate age-related decline. Among the lifestyle interventions that could improve healthspan, time restricted eating (TRE) is a promising candidate. TRE is a type of intermittent fasting that involves time-limited consumption of food during a specific time window. This dietary intervention has a demonstrated positive impact on some aspects of health both in pre-clinical models and clinical trials. The beneficial effects of TRE can occur at different physiological levels that are related to healthy aging, such as metabolism and body composition, circadian rhythms and sleep, and cognitive function. However, the mechanisms through which TRE may influence these aspects are not fully understood. One possibility is that TRE modulates physiological processes that contribute to aging. At the cellular and molecular level, the loss of proteostasis, epigenetic alterations and cellular senescence have been proposed as hallmarks of aging. Autophagy is one of the main proteolytic systems implicated in protein quality control and this crucial activity for cellular homeostasis decreases with age. Therefore, the effects of TRE on different aspects of aging may be mediated by autophagic processes. Regarding epigenetic alterations, variations in biological age determined by methylation markers may also be influenced by TRE. Since cellular senescence of the immune system is also crucial for aging, TRE could have an impact on aging by improving the organisms immunosenescence. Therefore, and considering current evidence pointing to a beneficial effect of the TRE on health we hypothesize that an intervention with TRE in overweight/obese individuals has a positive impact on their aging determinants (metabolism and body composition, circadian rhythms and sleep, quality of life, and cognitive function) which is associated with favorable changes in cellular traits of aging (autophagy, immunosenescence, and biological age). The results of this study will contribute to distinguish if TRE is an effective strategy to reduce the impact of overweight and metabolic syndrome on the quality of life. In addition, it will provide mechanistic insights towards the effect of TRE on physiological aspects that can influence hallmarks of aging. These data will be useful from a clinical perspective to manage subjects with obesity and metabolic syndrome, and save costs derived from their treatment. Overall, data generated in this project will be relevant for policy makers regarding guidelines on eating habits to reduce the impact of non-communicable diseases.

## INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso biológico que no se desarrolla con la misma dinámica en todas las personas, dando lugar a dinámicas de envejecimiento acelerado y dinámicas de envejecimiento saludable y ralentizado. El envejecimiento saludable se define como “el mantenimiento de la capacidad funcional que permite un estado de bienestar a edad avanzada”(1). La dinámica de envejecimiento está determinada por factores biológicos, demográficos, comportamentales, sociales y psicológicos (2). Entre los factores biológicos que determinan la dinámica y calidad del envejecimiento están el peso e índice de masa corporal (IMC), la prevalencia de enfermedades como la diabetes, enfermedad hepática o enfermedad cardiovascular (ECV) y marcadores bioquímicos como el perfil lipídico o la proteína C reactiva. La obesidad reduce la esperanza de vida en 5,8 años en hombres y en 7,1 años en mujeres a partir de los 40 años. La relación entre la obesidad y el envejecimiento está mediada por alteraciones en la integridad del ADN, tanto nuclear como mitocondrial, así como por alteraciones en la metilación del ADN, la inflamación y el deterioro funcional (3). La obesidad también se ha asociado con el deterioro cognitivo (4), alteraciones en el ritmo circadiano (5) y en la autofagia (6). Por otro lado, el órgano rector del control metabólico durante el ayuno es el hígado a través de glucogenólisis y fundamentalmente de gluconeogénesis. El proceso de envejecimiento, así como la obesidad, está íntimamente ligado a la disfunción hepática (7).

Entre las manifestaciones fenotípicas del envejecimiento encontramos el deterioro cognitivo, la sarcopenia, la fragilidad y las alteraciones del sueño (2). También existen factores extrínsecos que pueden considerarse potenciales moduladores de los factores biológicos y las manifestaciones fenotípicas del envejecimiento biológico. Entre estos factores, destacan la alimentación saludable y el ejercicio físico por su potencial para aminorar el declive fisiológico asociado a la edad (8). Por tanto, las intervenciones nutricionales se posicionan como importantes herramientas para atenuar el progreso del envejecimiento y sus manifestaciones fenotípicas (9). Entre las aproximaciones nutricionales estudiadas en relación con el envejecimiento, la ingesta restringida en el tiempo (TRE, de sus siglas en inglés *Time-restricted eating*) se presenta como una opción prometedora (10). El TRE es un tipo de ayuno intermitente que se basa en la ingesta de una cantidad no restringida de calorías en un periodo de tiempo limitado (ventana de alimentación), dejando un periodo del día de ayuno (ventana de ayuno) (11). Una ventaja del TRE respecto de otros protocolos de ayuno intermitente en los cuales la ventana de ayuno se prolonga, al menos, 24 horas es que el TRE, cuya ventana de ayuno es menor de 24 horas, permite la ingesta de alimentos diaria, lo que favorece la adherencia a este tipo de régimen dietético. Además, se ha mostrado que el TRE, incluso sin restricción calórica, aporta beneficios sobre la salud (12–15). Algunos de los efectos beneficiosos del TRE sobre la salud se relacionan con el envejecimiento saludable. Así, se ha mostrado que el TRE afecta positivamente a la regulación del metabolismo, la composición corporal, el ritmo circadiano y la función del cerebro. Algunos meta-análisis y ensayos clínicos han propuesto que el TRE promueve una reducción de los niveles de glucosa, lípidos, presión arterial, resistencia a la insulina y estrés oxidativo (12,16,17). El TRE también se ha mostrado eficaz para reducir el peso corporal, el perímetro de cintura, la masa grasa y la grasa visceral, especialmente en individuos con síndrome metabólico (SMet). Sin embargo, las evidencias de la relación del TRE con el sueño, el ritmo circadiano y la función cerebral son más limitados, aunque algunos sugieren un efecto positivo (12,13,18,19). Además, se ha sugerido que el ayuno intermitente puede mejorar parámetros de afectación hepática en enfermedad de hígado graso no alcohólico, como la esteatosis y la rigidez hepáticas. Si bien, no está claro si este efecto es debido al ayuno o a la reducción de la ingesta que suele acompañar al ayuno (20). Por tanto, los pacientes con afectación hepática asociada a la obesidad son un grupo de población que puede verse especialmente beneficiado de una intervención con TRE.

En relación al impacto del TRE sobre los marcadores de envejecimiento, se ha demostrado recientemente en ratones que el ayuno por sí solo es capaz de recapitular los efectos metabólicos, moleculares y geroprotectores de la restricción calórica (15). En humanos, el ayuno puede inducir la autofagia y modular la expresión de los genes reloj (12). La autofagia es un mecanismo proteolítico con un papel fundamental en el control energético celular. La capacidad de activar este proceso y su efectividad declinan con la edad, llevando a la pérdida de la proteostasis, una de las marcas del envejecimiento biológico (21,22). Existen evidencias que sugieren que la autofagia es un proceso mediador del efecto del TRE sobre los procesos del envejecimiento. Si bien el papel de la autofagia en la relación TRE-envejecimiento saludable no es bien conocido.

Finalmente, se ha propuesto que la edad biológica es marcador del estado de envejecimiento de un organismo (22). El envejecimiento biológico es un término que no cuenta con una definición de consenso, pero generalmente, se refiere a la medición de la edad de un organismo basada en marcadores del estado fisiológico que se muestran deteriorados con el envejecimiento (23). Existen diversas propuestas de algoritmo de cálculo de edad biológica que tienen en cuenta diversos marcadores bioquímicos, fenotípicos y moleculares. Uno de las ecuaciones de cálculo de edad biológica más utilizada es el DNAmPhenoage desarrollado por Levine y Horvath, que se basa en una combinación de marcadores fenotípicos y una huella de metilación asociada al envejecimiento (24). Las alteraciones epigenéticas, entre ellas aquellas que afectan a la metilación del ADN son reconocidas marcas de envejecimiento (21). Otras marcas de envejecimiento son la senescencia celular, especialmente la inmunosenescencia (25).

Por tanto, aunque algunos estudios han mostrado que el TRE afecta positivamente a parámetros antropométricos, cognitivos y metabólicos, la mayoría de los estudios se han realizado en modelos animales, siendo su efecto en humanos menos conocido. Las evidencias generadas hasta la fecha indican que los pacientes con afectación hepática asociada a la obesidad son un grupo de población que puede verse especialmente beneficiado de una intervención con TRE, aunque no está clara la contribución de la restricción calórica comúnmente asociada a procedimientos de ayuno sobre los efectos observados en los estudios en humanos consultados. Tampoco se conoce cómo el TRE puede modular la edad biológica. Nuestro estudio contribuirá a discernir el papel específico de la restricción calórica y la restricción temporal de la ingesta sobre parámetros metabólicos y fisiológicos comúnmente alterados en sujetos con obesidad con y sin afectación hepática y que juegan un papel fundamental en la determinación de la calidad del envejecimiento. El conocimiento generado con este estudio será de utilidad para diseñar estrategias de intervención sobre el estilo de vida basadas en el ayuno y dirigidas a mejorar la calidad del envejecimiento en la población adulta. Para contribuir a tal conocimiento, proponemos el desarrollo de un estudio piloto, controlado, aleatorizado y de grupos paralelos para examinar el efecto de una intervención de 6 meses con TRE sobre componentes que definen la edad biológica, en adultos, hombres y mujeres de 55-70 años con sobrepeso u obesidad.

## OBJETIVOS CONCRETOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Las **hipótesis** del estudio son:

- 1) Que el TRE es sostenible en adultos con sobrepeso/obesidad ( $IMC\ 27-35\ Kg/m^2$ ) en un periodo de 6 meses.
- 2) Que el TRE tiene efectos beneficiosos sobre el metabolismo y la composición corporal.
- 3) Que el TRE mejora el ritmo circadiano y la calidad del sueño.
- 4) Que el TRE mejora parámetros de la función cognitiva y la calidad de vida.

- 5) Que el TRE modula mecanismos moleculares relacionados con el envejecimiento como la autofagia, la inmunosenescencia y la edad biológica.

El **objetivo general** del estudio es investigar los efectos del TRE sin restricción calórica, en comparación con una intervención con restricción calórica pero sin control cronobiológico y con una intervención control basada en recomendaciones para adherirse a una dieta mediterránea sobre parámetros relacionados con el envejecimiento saludable, incluyendo el metabolismo, la composición corporal, los ritmos circadianos, la calidad del sueño, la calidad de vida, la función cognitiva y mecanismos moleculares del proceso de envejecimiento.

Los **objetivos específicos** son:

- 1) Examinar la adherencia a un protocolo de TRE sin restricción calórica, en comparación con la adherencia a un protocolo de restricción calórica sin control temporal de la ingesta y a una dieta control basada en recomendaciones para seguir una dieta mediterránea, sin control temporal de la ingesta, y sin restricción calórica durante un periodo de 6 meses.
- 2) Investigar el efecto de las intervenciones sobre el metabolismo y la composición corporal.
- 3) Investigar el efecto de las intervenciones sobre los ritmos circadianos y la calidad del sueño.
- 4) Investigar el efecto de las intervenciones sobre la función cognitiva, el estado de ánimo y la calidad de vida.
- 5) Investigar la relación entre el TRE, la restricción calórica y los mecanismos moleculares del proceso de envejecimiento: autofagia, inmunosenescencia y edad biológica.

## METODOLOGÍA

### Resumen

Proponemos un ensayo clínico de intervención nutricional, abierto, controlado, aleatorizado y de grupos paralelos para comparar el efecto de una intervención de 6 meses basada en ingesta restringida en el tiempo (TRE) sin restricción calórica, en comparación con un grupo con restricción calórica pero sin restricción temporal de la ingesta y con un grupo control con recomendaciones para seguir una dieta mediterránea, sin restricción temporal de la ingesta, sobre parámetros relacionados con la calidad del envejecimiento.

Nuestro grupo tiene experiencia previa en el desarrollo de ensayos clínicos de intervención nutricional, alcanzando una destacable adherencia a los protocolos de intervención. Por ejemplo, el estudio PREDIMED-Plus incluye una restricción calórica en el grupo de intervención con una duración de la intervención de 6 años. La adherencia al protocolo de dieta mediterránea restringida en energía se mide mediante un cuestionario específicamente desarrollado a tal efecto (26). El grupo de intervención alcanzó una puntuación de 12 (DE 2.8) sobre 17 en los primeros 6 meses, suponiendo un incremento de 4.4 (DE 3.4) puntos sobre la puntuación al inicio del estudio. Además, en este estudio tenemos un porcentaje de abandonos de tan solo un 2.4% y una asistencia a las visitas grupales del 73.1% en el grupo de intervención (datos de julio 2022). Por tanto, en base a nuestra experiencia previa, estimamos que la intervención alcanzará el 78% de adherencia, similar a lo observado en otros ensayos que incluyen TRE (8).

### Características de la población reclutada

Los voluntarios son hombres y mujeres adultos (55-70 años) con sobrepeso u obesidad (IMC 27-35 Kg/m<sup>2</sup>) con un periodo de alimentación habitual ≥ 14 h/día y con ritmos de sueño y peso estable en los 3 meses precedentes al inicio de la intervención.

La siguiente tabla detalla los criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión*
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hombres y mujeres</li> <li>• 50-70 años</li> <li>• IMC: 25-40 Kg/m<sup>2</sup></li> <li>• Presencia de enfermedad hepática por hígado graso detectada por Ecografía o por biomarcadores (Puntuación Fatty Liver Index &gt; 30 puntos en caso de falta de acceso a ecografía de screening). EASL, Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease, 2016.</li> <li>• Periodo diario de alimentación habitual al inicio ≥ 12 h</li> <li>• Ciclo de sueño regular en el mes anterior al inicio del estudio (7 ± 2 horas de sueño diario)</li> <li>• Peso estable en los 3 meses anteriores al inicio del estudio (cambios de peso ≤ 4 Kg)</li> <li>• Sin planes para cambiar su nivel de actividad física en los 6 meses siguientes al inicio del estudio</li> <li>• No estar siguiendo una dieta para la pérdida de peso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No cumplir los criterios de inclusión</li> <li>• Mujeres en edad reproductiva, sin menopausia establecida (12 meses previos sin periodo menstrual)</li> <li>• Consumo excesivo de alcohol (puntuación en cuestionario CAGE &gt; 2, Ewing, 1984; Malet et al. 2005)</li> <li>• Fumadores que hayan cambiado su hábito tabáquico en los 6 meses precedentes al inicio del estudio (incluyendo el inicio o el fin del hábito)</li> <li>• Enfermedad renal diagnosticada.</li> <li>• Enfermedad cardiovascular o angina de pecho prevalente</li> <li>• Enfermedad hepática diferente a la enfermedad de hígado graso no alcohólico</li> <li>• Enfermedad endocrina no controlada (hipotiroidismo, hipertiroidismo, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, enfermedad de glándula adrenal)</li> <li>• Hipertensión no controlada</li> <li>• Pancreatitis</li> <li>• Estar bajo tratamiento médico que afecte al peso, a la ingesta, al gasto energético o al sueño en los 3 meses precedentes al inicio del estudio</li> <li>• Alergias o intolerancias alimentarias que impidan seguir el protocolo de intervención</li> <li>• Alteraciones del comportamiento alimentario diagnosticadas</li> <li>• Trabajadores a turnos</li> <li>• Participación en otro estudio que pueda interferir con el presente estudio</li> <li>• Factores sociales, culturales o psicológicos que puedan afectar a la adherencia al</li> </ul>

	protocolo de intervención (p.e. incapacidad para ingerir alimentos sólidos, residencia no permanente, estar institucionalizado)
--	---

\*No controlado, se refiere a medicación no estable en los 3 meses precedentes al inicio del estudio.

#### Tamaño muestral

La variable de cálculo del tamaño muestral es el porcentaje de peso perdido respecto del momento basal. Elegimos esta variable en base a estudios previos que muestran, consistentemente, que participantes bajo una intervención con TRE reducen su peso un 3% (8–11,16). Nuestro ensayo clínico de intervención tendrá el diseño de un ensayo controlado, abierto, aleatorizado, de grupos paralelos en el que se utilizará una prueba ANOVA de dos vías para comparar los cambios de las variables entre los tres brazos de la intervención. Nuestro cálculo de tamaño muestral considera 3 grupos de intervención, con una diferencia de pérdida de peso del 5% entre los grupos y una variabilidad en la pérdida de peso dentro de cada grupo del 50%. Asumimos un nivel de significación de 0.05 (error de tipo I) y una potencia del 80% (error de tipo II). El cálculo del tamaño muestral se ha realizado con la función power.anova.test de R versión 4.1.3 (2022-03-10) con el programa RStudio. De acuerdo con estos parámetros, son necesarios 49 participantes por cada grupo. Asumiendo una pérdida de seguimiento del 20%, requerimos 59 participantes por grupo para alcanzar la significación en el parámetro propuesto. Por tanto, reclutaremos 177 participantes con una proporción de sexos aproximada de 1:1.

#### Reclutamiento de los participantes

El reclutamiento se llevará a cabo en colaboración con los investigadores del Servicio de Medicina Interna de la Clínica Universidad de Navarra (CUN) de Madrid, que son miembros integrantes del equipo de investigación. Además, solicitaremos la colaboración de los centros de atención primaria de la Comunidad de Madrid. El grupo de investigación lleva a cabo, en la actualidad, 3 ensayos clínicos, que suponen 200 personas/año de seguimiento y en el que participan 10 centros de atención primaria. Por tanto, la experiencia previa del grupo en el reclutamiento de participantes para estudios, tanto observacionales, como ensayos de campo de intervención aseguran el cumplimiento de los objetivos de reclutamiento.

Tanto los investigadores de la CUN, como los facultativos de atención primaria serán los encargados de identificar pacientes que cumplan los criterios de inclusión/exclusión de entre todos aquellos que acudan a su consulta y plantearán su participación en el estudio. Si el paciente se muestra interesado en participar, será contactado por los investigadores de IMDEA Alimentación, quienes explicarán el estudio con detalle, recabarán los consentimientos informados y serán los encargados de llevar a cabo las visitas clínicas de intervención y recogida de datos.

El reclutamiento de los participantes por personal médico se hará atendiendo a los principios de las Buenas Prácticas Clínicas en la International Conference of Harmonization, garantizando la protección de los derechos, la seguridad y el bienestar de los pacientes, de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y asegurando la máxima calidad asistencial de los pacientes independientemente de su participación en el estudio.

#### Selección de los participantes

El personal facultativo, médicos y enfermeros/as de la CUN y los centros de atención primaria colaboradores identificarán los potenciales participantes de entre sus pacientes, a quienes se invitará a participar en el estudio. Aquéllos que hayan mostrado interés en participar serán entrevistados para la determinación de los criterios de inclusión/exclusión en una visita de selección (visita S). En esta

entrevista de selección, se les pedirá el consentimiento informado. Si cumplen los criterios de inclusión/exclusión y han consentido en participar, se les dará una cita para la visita basal y la visita para la toma de muestra.

#### Protocolo de intervención

##### ➤ *Esquema de visitas*

El protocolo del ensayo se inicia con la **visita de selección (visita S)** que consiste en:

- 1) La explicación detallada del estudio y la respuesta a preguntas y dudas de los participantes.
- 2) La firma de 3 consentimientos informados: el consentimiento para la participación en el estudio (Anexo I), el consentimiento para recabar datos genéticos (Anexo II) y el consentimiento para ser incluidos en una base de datos del programa de investigación para ser contactados en futuros estudios (Anexo III).
- 3) La realización de mediciones antropométricas y de composición corporal.
- 4) La administración de un cuestionario de selección que incluye el cribado de los criterios de inclusión/exclusión, datos generales (fecha de nacimiento, edad y lugar de procedencia), antecedentes médicos, medicación y abuso de drogas.
- 5) La evaluación del consumo de alcohol de riesgo con el cuestionario CAGE (27).
- 6) Cuestionario de motivación: Se realizarán dos preguntas de motivación que se definirán mediante una escala de Likert de 1 a 5 puntos:
  - ¿En qué grado cree que está motivado para cambiar su hábito dietético de acuerdo con el protocolo del estudio?
  - ¿En qué grado se ve capaz de modificar su hábito dietético de acuerdo con el protocolo del estudio?

Sólo aquellos voluntarios que puntúen con una media de 3 o más considerando ambas preguntas serán incluidos en el estudio.

El participante seleccionado será entonces citado para la **visita basal (visita V\_00)**. En la visita S se les proporcionará enlace para acceder a una plantilla digital para realizar un registro dietético de 3 días que deberán entregar cumplimentado antes de la visita basal. Además, se les pondrá un acelerómetro y un monitor de glucosa que recogerá datos de actividad física y sueño y de niveles de glucosa de forma continuada durante 7 días y que entregarán, igualmente, el día de la visita basal. Así mismo, se les proporcionará el material para la recogida de heces y orina, que deberán traer el día de la toma de muestra.

La visita V\_00 consistirá en:

- 1) La administración del cuestionario basal que incluye:
  - datos sociodemográficos: edad, sexo, fecha de nacimiento, procedencia rural o urbana, número de personas con las que comparte el hogar, nivel máximo de estudios alcanzados y años de escolarización
  - hábito tabáquico
  - hábito de sueño: horas diarias de sueño en días laborables y fin de semana
  - actividad laboral

- hábitos de ocio: tiempo dedicado a la televisión o a otro ocio con pantallas en días laborables y fines de semana
  - antecedentes clínicos
  - medicación
- 2) La evaluación del patrón de alimentación con un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFC) validado para la población española (28,29) y el cuestionario de adherencia a dieta mediterránea MEDAS (30).
  - 3) La evaluación de la calidad de vida con el cuestionario SF-36 (31) y del estado del bienestar con el cuestionario W-BQ12 (32–34).
  - 4) La evaluación de la calidad del sueño con el cuestionario de calidad del sueño de Pittsburg (35) y el cuestionario de matutinidad/vespertinidad (MEQ) (36).
  - 5) La evaluación del nivel de actividad física con el cuestionario iPAQ y REGICOR (37)
  - 6) La evaluación del estado de depresión con el cuestionario Beck (38).
  - 7) La evaluación de la ingesta emocional con el cuestionario de comedor emocional de la Universidad de Murcia (EEQ) (39) y del estado de ánimo con los cuestionarios de escala de ansiedad de Hamilton (HARS) (40), cuestionario de alteraciones de los ritmos biológicos (BRIAN) (41) y la escala EVEA para la evaluación del estado del ánimo (42).
  - 8) La evaluación de la función cognitiva con la Lista Verbal del Rey (RAVLT) (43) y el test STROOP de colores y palabras (SCWT) (44).
  - 9) La repetición de las mediciones antropométricas y de composición corporal (BIA y DXA).
  - 10) Elastografía hepática.
  - 11) Calorimetría indirecta.
  - 12) La medición de la tensión arterial.

Los cuestionarios MEDAS, SF-36, Pittsburg, MEQ, Beck, HARS, BRAN y EEQ y se les proporcionará a los participantes un modelo digital a través de un enlace y/o código QR. La duración prevista de esta visita V\_00 es de 75 minutos.

En esta visita se les indicará el grupo en el que han sido aleatorizados y se les dará el material formativo y las instrucciones relativas al grupo que corresponda.

Una vez comenzada la intervención, se realizarán **visitas telefónicas** los meses 1, 2, 4 y 5 (**Visitas V\_T1, V\_T2, V\_T4 y V\_T5**). En dichas visitas telefónicas se pasará un cuestionario de adherencia a la intervención que consistirá en preguntar acerca de los tiempos de las comidas, las dificultades encontradas para adherirse a la intervención y se propondrán opciones para superar dichas dificultades. Además, se preguntará por la aparición de efectos adversos que puedan ser debidos a la intervención y que incluyen; sensación de cansancio, debilidad, dolores de cabeza, alteraciones gastrointestinales, apariciones de alergias/intolerancias y cualquier otro síntoma no apreciado antes de la intervención. El equipo clínico del proyecto valorará la aparición de cualquier evento y su asociación con la intervención.

En el tercer mes de la intervención, se citará al participante a una nueva **visita presencial (visita V\_M3)**. En dicha visita se recabará información sobre la adherencia a la intervención y la aparición de efectos adversos de manera similar a las visitas telefónicas. Se pedirá al participante que complete, de nuevo,

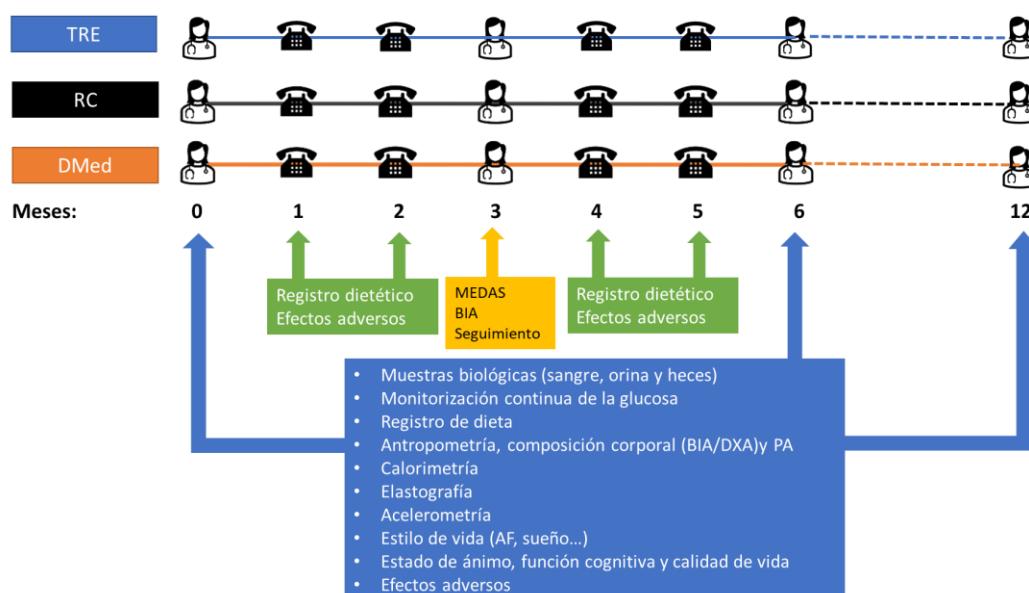
el registro dietético de 3 días en formato digital. Además, se tomarán las medidas de peso y composición corporal (BIA) y de presión arterial.

La intervención finalizará a los 6 meses, momento en el que se realizará la **visita final (V\_M6)**. En dicha visita se repetirán los cuestionarios y las mediciones de la visita V\_00 excepto datos sociodemográficos y antecedentes clínicos). Se pedirá al participante que complete, de nuevo, el registro dietético de 3 días en formato digital. También se colocará el acelerómetro y el monitor de glucosa. El participante acudirá a IMDEA a los 7 días para retirar estos dispositivos.

Finalmente, se realizará una visita adicional 6 meses después de finalizada la intervención (V\_M12) para determinar el grado de adherencia a la intervención con TRE a largo plazo y su efecto sobre los marcadores propuestos tras 12 meses de seguimiento.

En las visitas V\_00, V\_M6 y V\_M12 se realizará la toma de muestra. La toma de muestra podrá coincidir con el día de la visita o ser citada otro día. La organización de la toma de muestras dependerá de la organización del laboratorio y el servicio de extraccionista y de las propias preferencias de los participantes.

La siguiente figura detalla el esquema de la intervención:



TRE: *ingesta restringida en el tiempo*; RC: *restricción calórica*; DMED: *dieta mediterránea*

El número total y duración de las visitas se detalla en el siguiente cuadro:

Nº	Visita	Duración (minutos)
1	V_S (selección)	30
2	Visita de pruebas técnicas*	60
3	V_00 (basal)	80
4	Toma de muestra **	10
5	Retirada de acelerómetro y monitor de glucosa ***	10
6	V_T1 (telefónica)	5
7	V_T2 (telefónica)	5

8	V_M3 (presencial intermedia)	80
9	V_T4 (telefónica)	5
10	V_T5 (telefónica)	5
11	Visita de pruebas técnicas*	60
12	V_M6 (final)	80
13	Toma de muestra **	10
14	Retirada de acelerómetro y monitor de glucosa ***	10
15	Visita de pruebas técnicas*	60
16	V_M12	80
17	Toma de muestra**	10
18	Retirada de acelerómetro y monitor de glucosa***	10

\* La visita de pruebas técnicas se refiere a la realización de densitometría, elastografía y calorimetría y podrá hacerse coincidir con la visita de toma de muestra o con la visita de intervención correspondiente.

\*\* La visita para la toma de muestra podrá coincidir con la visita de intervención correspondiente.

\*\*\* La visita para la retirada del acelerómetro y el monitor de glucosa podrá coincidir con la visita de toma de muestra o la visita de intervención correspondiente.

#### ➤ Aleatorización de los participantes

Los participantes serán aleatoriamente asignados a los diferentes grupos de intervención usando un método de aleatorización completo por bloques. Se definirá el tamaño de cada grupo ( $n = 59$ ) y los bloques de aleatorización serán sexo (hombre/mujer) y rango de edad (55-59 años /60-70 años). De este modo, ambos grupos serán comparables en sexo y edad. La aleatorización se llevará a cabo usando el paquete randomizr de R. Los participantes que formen parte de la misma unidad familiar serán aleatorizados al mismo grupo en clúster.

#### ➤ Desarrollo de la intervención

La intervención será de tipo abierto, pues cada participante será informado del grupo al que ha sido asignado en la visita V\_00. La duración total de la intervención será de 6 meses. La intervención para cada grupo será la siguiente:

- **Grupo TRE ( $n = 59$ ):** los participantes seguirán una dieta de tipo mediterráneo, sin restricción energética, durante un periodo de alimentación permitido de 10 horas, dejando 14 horas de ayuno. El participante podrá elegir la ventana de 10 horas de alimentación que mejor se ajuste a sus hábitos, si bien se le dará un rango de selección desde las 06:00 a las 20:00 horas. Durante el periodo de ayuno se podrá ingerir agua y otras bebidas no calóricas. El periodo de TRE deberá ser llevado a cabo tanto en días laborables como en fin de semana.
- **Grupo RC ( $n = 59$ ):** los participantes seguirán una dieta de tipo mediterráneo con un 25% de restricción calórica, sin restricción en el horario de alimentación. Para llevar a cabo la restricción calórica, se calculará la ingesta adecuada de acuerdo con su peso actual con la fórmula de Harris-Benedict, corrigiendo por el factor de actividad física. A la ingesta calculada de tal manera, se le restará el 25%. Se elaborará un menú de tipo mediterráneo con el tamaño

de porciones que asegure la ingesta definida para cada participante. Se hará uso del material ya disponible del ensayo PREDIMED-Plus.

- **Grupo DMEd (n = 59):** los participantes podrán seguir su dieta habitual, sin restricción en el horario de alimentación. Si bien, debido a su condición de sobrepeso u obesidad, se les darán recomendaciones generales para seguir un patrón de dieta saludable de tipo mediterráneo.

Para medir la adherencia a la intervención, se pedirá a todos los participantes, independientemente del grupo de intervención, el seguimiento de un registro diario de las horas de despertarse y dormir y de las diferentes comidas. Además, se utilizará un sistema de monitorización continua de la glucosa en las visitas V\_00, V\_M3 y V\_M6 que permitirá identificar los momentos de las comidas. Los registros de horas se recogerán y revisarán en las visitas, tanto presenciales, como telefónicas (previo envío de los registros por correo electrónico).

Al final de la intervención (VM\_12), todos los participantes, de todos los grupos, recibirán un informe de resultados que incluirá la evolución de sus parámetros antropométricos y de composición corporal, de los parámetros de calidad del sueño, estado de ánimo, calidad de vida y cognitivos. También recibirán datos sobre la evaluación de sus hábitos de actividad física y de dieta con recomendaciones específicas para mejorar su estilo de vida.

#### Recogida de muestras y datos y determinaciones

##### ➤ *Recogida de muestra biológica*

La toma de la muestra se llevará a cabo en las instalaciones de IMDEA Alimentación, debidamente acreditadas para la realización de ensayos en humanos, o en los centros de atención primaria de los participantes si estos manifiestan dificultades para trasladarse a IMDEA Alimentación. La muestra de sangre se obtendrá mediante punción venosa, en ayunas y por personal debidamente acreditado para ello.

Se recogerán las siguientes muestras:

- Orina: la primera orina de la mañana se recogerá en un bote de 100 mL y se repartirá en alícuotas de 1 mL (10 alícuotas) que se congelarán a -80°C hasta su uso.
- Sangre: se recogerán 2 tubos de EDTA de 10 mL. De uno de los tubos se obtendrá el plasma por centrifugación, del otro tubo se obtendrá la fracción celular que se aislará con Lymphoprep (Stemcell) siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra de plasma se repartirá en alícuotas de 500 µL y se congelará a -80°C. La fracción celular se criopreservará en nitrógeno líquido.
- Heces: la muestra fecal de la mañana se recogerá en un contenedor para heces con espátula y se mantendrá en fresco (4°C) hasta su entrega en el laboratorio. Las muestras se almacenarán a -80°C hasta su uso.

La muestra de plasma se utilizará para las determinaciones bioquímicas habituales y los marcadores de envejecimiento. La fracción celular criopreservada se utilizará para la medición de la inmunosenescencia, el flujo autofágico, la metilación del ADN y un estudio metabolómico por resonancia magnética nuclear.

Se solicitará también una muestra de heces para realizar estudios de microbiota en un futuro y de acuerdo con subproyectos específicos para los que se solicitará la correspondiente financiación. En la hoja de información al paciente y el consentimiento informado se hará constar la recogida de muestras para futuros estudios y se pedirá el consentimiento correspondiente para su colección y almacenamiento.

➤ *Recogida de datos*

La siguiente tabla detalla los datos recogidos, su utilidad y los instrumentos de recogida de datos:

Categoría	Dato	Instrumento	Uso
<b>Datos generales</b>	Generales	CRD específico	Recoge los datos sociodemográficos, antecedentes clínicos y medicación
<b>Estilo de vida</b>	Alimentación	CFCA	Consumo habitual de alimentos en un año natural
		Registro de 3 días	Determinar cambios en la alimentación a lo largo de la intervención.
		MEDAS*	Medición de la adherencia a la dieta mediterránea
	Actividad física	iPAQ	Determinar el nivel de actividad física laboral y en el tiempo libre, así como el grado de cumplimiento con las recomendaciones de la OMS
		REGICOR	Determinar el gasto energético en actividad física en el tiempo libre en Mets/min/semana
		Acelerómetro	Medición directa del nivel e intensidad de la actividad física
	Calidad de vida	SF-36*	Determinación de la calidad de vida
	Estado de Bienestar	W-BQ12*	Determinación del estado del bienestar
	Ansiedad	HARS*	Identificación de desórdenes afectivos y ansiedad
	Ritmos biológicos	BRIAN*	Determinación de los ritmos biológicos en actividades cotidianas y sociales, patrones rítmicos de alimentación y cronotipo
<b>Datos de comportamiento, sueño y estado de ánimo</b>	Comportamiento alimentario	EEQ*	Clasificación del grado de comedor emocional
	Estado de ánimo	EVEA	Determinación del estado de ánimo en el momento actual

	Depresión	Beck*	Determinación del grado de depresión
Función cognitiva	Sueño	Pittsburg (PSQI)*	Calidad del sueño
		MEQ*	Ritmos de sueño
		Acelerómetro	Medición directa del ritmo y la calidad del sueño
Función cognitiva	Función cognitiva	RAVLT	Medición del grado de aprendizaje y memoria verbal
		SCWT	Medición de la flexibilidad cognitiva, la atención selectiva y la inhibición cognitiva

\* Estos cuestionarios se realizarán de forma autorreportada.

➤ *Determinaciones*

El nivel e intensidad de la actividad física, así como la cantidad y calidad del sueño de medirán con un acelerómetro Fitbit Versa 3 que se colocará en el brazo no dominante y se configurará para que tome mediciones durante 14 días de forma continua.

Los cambios en los niveles de glucosa, así como los momentos específicos de la ingesta de los participantes se medirán mediante la monitorización continua de la glucosa con un dispositivo CGM FreeStyle 2 (Abbot, USA) que el participante portará, de forma ininterrumpida, durante 14 días. Se proporcionará a los participantes instrucciones precisas sobre el uso del dispositivo, que se dispondrá en la parte posterior del brazo y se configurará para que mida la glucosa con una frecuencia de cada minuto.

Las mediciones de antropometría y composición corporal incluyen la altura, el peso, el perímetro de cintura y la composición corporal en 5 segmentos (extremidades superiores, inferiores y tronco). La altura se medirá en un estadiómetro sujeto a la pared. El peso y la composición corporal se medirán en una Tanita RD545. El perímetro de cintura se medirá en el punto intermedio entre la última costilla y la cresta ilíaca tras una espiración profunda y con una cinta métrica flexible. Las mediciones antropométricas se realizarán con el participante descalzo y portando ropas ligeras. La presión arterial se medirá con un monitor Omron M2 en posición sentada y tras 5 minutos de reposo. Se realizarán 3 mediciones separadas entre sí 1 minuto.

Adicionalmente, la composición corporal se medirá mediante densitometría ósea con un equipo Hologic W, en las visitas V\_001, V\_06 y V\_12. Se realizará una medición de cuerpo entero y se analizará la composición corporal en 7 segmentos (cabeza, tronco, brazo derecho, brazo izquierdo, pierna derecha, pierna izquierda y región androide/ginoide). La densitometría ósea se llevará a cabo por personal debidamente acreditado para operar con instalaciones radiológicas.

El efecto de la intervención sobre el metabolismo hepático se medirá en el plasma a partir de los niveles de AST, ALT, GGT, albúmina, neutrófilos, linfocitos y plaquetas obtenidos en el análisis bioquímico convencional. Además, se medirán metabolitos específicos hepáticos mediante una aproximación metabolómica con resonancia magnética nuclear (Nightingale Health, Helsinki, Finlandia). El efecto de la intervención sobre la salud hepática se llevará a cabo mediante elastografía hepática con el FibroScan® con SmartExam y CAP para la determinación del grado de esteatosis y fibrosis hepática (45).

El gasto calórico se estimará con la ecuación de Harris-Benedict y se medirá objetivamente mediante calorimetría indirecta en reposo con el equipo Metalyzer. Se realizará una evaluación de intercambio de gases de 30 minutos y se seleccionará de manera automática, mediante el Software Cortex, el intervalo de 5 minutos que genere la medición de mayor calidad, procurando siempre superar el umbral de calidad de 40 puntos sobre 100, de acuerdo con las especificaciones del equipo y del software.

La metilación del ADN se medirá a partir de la fracción celular tras aislar el ADN, tratarlo con bisulfito sódico y cuantificar el porcentaje de metilación con el Infinium Methylation EPIC Chip (Illumina, San Diego, CA, USA). La inmunosenescencia se medirá como el porcentaje de linfocitos T senescentes del total de población de linfocitos mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCelesta SORP (BD Biosciences). El flujo de autofagia se medirá también en la fracción celular con el kit Cyto-ID Green Dye (Enzo).

## CONSIDERACIONES ÉTICAS:

El presente estudio se realizará de acuerdo con el protocolo y los principios de la Buena Práctica Clínica:

1. Guía ICH para la Buena Práctica Clínica (ICH Harmonised Tripartite Guidelines for Good Clinical Practice) 1996.
2. Directiva 91/507/EEC, Las normas que rigen los productos medicinales en la Comunidad Europea (The Rules Governing Medicinal Products in the European Community).
3. Código 21 de las regulaciones federales de EE.UU. que trata de los estudios clínicos (incluidas las secciones 50 y 56 relativas al consentimiento informado y las regulaciones IRB).
4. Declaración de Helsinki y enmiendas, relativas a la investigación médica en humanos (Recommendations Guiding Physicians in Biomedical Research Involving Human Subjects). Esto incluye la nota de aclaración del párrafo 29 que acompaña a la versión de Edimburgo de 2000 de la Declaración de Helsinki y las modificaciones derivadas de la 64<sup>a</sup> Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013.
5. Los principios y garantías de la investigación biomédica contenidos en el artículo 2 de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y las determinaciones del uso de muestras biológicas definidas por el capítulo III del título V de dicha ley.

El Investigador acepta al firmar el protocolo atenerse a las instrucciones y procedimientos descritos en él y, por tanto, ajustarse a los principios de la Buena Práctica Clínica según los cuales se rige.

## INFORMACIÓN AL SUJETO PARTICIPANTE

A los candidatos elegidos se les explicarán detalladamente todos los procedimientos y el compromiso de tiempo previsto. Se especificará a los participantes que si no cumplen los criterios de inclusión serán excluidos del estudio. Se les dará una hoja de información al paciente (Anexo I) que contendrá la información sobre el estudio en lenguaje comprensible para el público general. La hoja de información contendrá los datos de contacto de la persona responsable del estudio en IMDEA Alimentación a quien podrá dirigir cuantas dudas tenga sobre el desarrollo del mismo. El formulario de consentimiento informado incluirá una declaración que permita a los investigadores guardar y ceder los datos y las muestras para futuros estudios de investigación.

## CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS

A cada participante se le asignará un código ID de participante que no permitirá la identificación del paciente. Todos los documentos de recogida de datos, así como las muestras biológicas estarán identificadas únicamente con dicho código ID. Existirá un fichero que permita identificar al participante con su código ID. Dicho fichero se guardará en un dispositivo sin conexión a internet y protegido con contraseña. Existirá otro fichero que contendrá los datos de contacto del participante (nombre completo, dirección, teléfono y dirección de correo electrónica). Dicho fichero se guardará, igualmente, en un dispositivo sin conexión a internet y protegido por contraseña. Los dispositivos que contengan ambos ficheros estarán guardados bajo doble llave (cajón con llave + despacho cerrado con llave). Sólo el investigador responsable del estudio en IMDEA Alimentación o persona en quien delegue tendrá acceso a dichos dispositivos. Sólo el personal encargado del reclutamiento y la recogida de datos tendrán acceso a los datos de identificación y contacto del participante.

La muestra biológica donada por los voluntarios será identificada con el código ID del participante. El código no permitirá la identificación del voluntario. Por tanto, las muestras biológicas estarán codificadas y disociadas tanto en su almacenamiento en los congeladores de IMDEA Alimentación como en la base de datos donde se incluirán los futuros resultados.

En todo caso, los datos recogidos serán protegidos conforme a lo establecido por la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y el reglamento (UE) 2016/679 de protección de datos.

## FINANCIACIÓN

El presente proyecto está financiado por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 a través del Programa «Proyectos de Generación de Conocimiento», en el marco del Programa Estatal para Impulsar la Investigación Científico-Técnica y su Transferencia, del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2021-2023, en su convocatoria de 2021(PID2021-125899OB-I00).

## PLAN DE TRABAJO

Objetivo	Actividad	Miembros	Meses								
			M1-M3	M4-M6	M7-M9	M10-M12	M13-M15	M16-M18	M19-M21	M21-M24	M25-M27
O1	Reunión de inicio	JMO, LDR, CMP, ECS, DMU, AH, CC	■								
	Formación del personal de campo	LDR, ECS, DMU, AH, facultativos de centros de salud	■								
	Reclutamiento	LDR, ECS, DMU, AH, CC, facultativos de centros de salud		■	■	■					
	Intervención y seguimiento de participantes	LDR, ECS, DMU, AH		■	■	■		■	■	■	
	Recogida de datos	LDR, ECS, CC		■	■	■		■	■	■	
	Recogida de muestras	ECS, CC, facultativos de los centros de salud		■	■	■		■	■	■	
	Procesamiento de las muestras	CC		■	■	■		■	■	■	
	Desarrollo y mantenimiento de la base de datos	CMP,		■	■	■		■	■	■	■
O2	Estudio del efecto del TRE sobre el metabolismo y la composición corporal	LDR, ECS, JMO, CMP					■	■	■	■	
O3	Estudio del efecto del TRE sobre el sueño y el ritmo circadiano	LDR, ECS					■	■	■	■	
O4	Estudio del efecto del TRE sobre la función cognitiva, el estado de ánimo y la calidad de vida	ECS, CMP, DMU, AH					■	■	■	■	
O5	Estudio de los marcadores de envejecimiento	LDR, CMP, CC					■	■	■	■	

JMO: José Mª Ordovás; LDR: Lidia Daimiel Ruiz; CMP: Celia Martínez-Pérez; ECS: Esther Cuadrado Soto; DMU: Diego Martínez Urbistondo; AH: Ana Huertas; CC: Cristina Climent

## REFERENCIAS

1. Organization WH. Decade of Healthy Ageing: baseline report [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240017900>
2. Kral C. Healthy Ageing; a Sistematic Review. 2018.
3. Tam BT, Morais JA, Santosa S. Obesity and ageing: Two sides of the same coin. *Obes Rev* an Off J Int Assoc Study Obes. 2020 Apr;21(4):e12991.
4. Grasso P. Harnessing the Power of Leptin: The Biochemical Link Connecting Obesity, Diabetes, and Cognitive Decline. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:861350.
5. Chaput J-P, McHill AW, Cox RC, Broussard JL, Dutil C, da Costa BGG, et al. The role of insufficient sleep and circadian misalignment in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2022 Oct;1–16.
6. Behl T, Sehgal A, Bala R, Chadha S. Understanding the molecular mechanisms and role of autophagy in obesity. *Mol Biol Rep*. 2021 Mar;48(3):2881–95.
7. Bilson J, Sethi JK, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: a multi-system disease influenced by ageing and sex, and affected by adipose tissue and intestinal function. *Proc Nutr Soc*. 2022 May;81(2):146–61.
8. Liu T, Li N, Hou Z, Liu L, Gao L, Wang L, et al. Nutrition and exercise interventions could ameliorate age-related cognitive decline: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Aging Clin Exp Res*. 2021 Jul;33(7):1799–809.
9. Roberts SB, Silver RE, Das SK, Fielding RA, Gilhooly CH, Jacques PF, et al. Healthy Aging-Nutrition Matters: Start Early and Screen Often. *Adv Nutr*. 2021 Jul;12(4):1438–48.
10. Longo VD, Panda S. Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metab*. 2016 Jun;23(6):1048–59.
11. Hofer SJ, Carmona-Gutierrez D, Mueller MI, Madeo F. The ups and downs of caloric restriction and fasting: from molecular effects to clinical application. *EMBO Mol Med*. 2022 Jan;14(1):e14418.
12. Jamshed H, Beyl RA, Della Manna DL, Yang ES, Ravussin E, Peterson CM. Early Time-Restricted Feeding Improves 24-Hour Glucose Levels and Affects Markers of the Circadian Clock, Aging, and Autophagy in Humans. *Nutrients*. 2019 May;11(6).
13. Currenti W, Godos J, Castellano S, Caruso G, Ferri R, Caraci F, et al. Association between Time Restricted Feeding and Cognitive Status in Older Italian Adults. *Nutrients*. 2021 Jan;13(1).

14. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab.* 2012 Jun;15(6):848–60.
15. Pak HH, Haws SA, Green CL, Koller M, Lavarias MT, Richardson NE, et al. Fasting drives the metabolic, molecular and geroprotective effects of a calorie-restricted diet in mice. *Nat Metab.* 2021 Oct;3(10):1327–41.
16. Wilkinson MJ, Manoogian ENC, Zadourian A, Lo H, Fakhouri S, Shoghi A, et al. Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. *Cell Metab* [Internet]. 2020;31(1):92–104.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.004>
17. Cienfuegos S, Gabel K, Kalam F, Ezpeleta M, Wiseman E, Pavlou V, et al. Effects of 4- and 6-h Time-Restricted Feeding on Weight and Cardiometabolic Health: A Randomized Controlled Trial in Adults with Obesity. *Cell Metab* [Internet]. 2020;32(3):366–378.e3. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413120303193>
18. McStay M, Gabel K, Cienfuegos S, Ezpeleta M, Lin S, Varady KA. Intermittent Fasting and Sleep: A Review of Human Trials. *Nutrients.* 2021 Oct;13(10).
19. Tian H-H, Aziz A-R, Png W, Wahid MF, Yeo D, Constance Png A-L. Effects of fasting during ramadan month on cognitive function in muslim athletes. *Asian J Sports Med.* 2011 Sep;2(3):145–53.
20. Lavallee CM, Bruno A, Ma C, Raman M. The Role of Intermittent Fasting in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Narrative Review. *Nutrients.* 2022 Nov;14(21).
21. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* [Internet]. 2013 Jun 6;153(6):1194–217. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23746838>
22. Jazwinski SM, Kim S. Examination of the Dimensions of Biological Age. *Front Genet.* 2019;10:263.
23. Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S. Biological Age Predictors. *EBioMedicine.* 2017 Jul;21:29–36.
24. Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY).* 2018 Apr;10(4):573–91.
25. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology.* 2007 Apr;120(4):435–46.
26. Schroder H, Dolors Zomeno M, Angel Martinez-Gonzalez M, Salas-Salvado J, Corella D, Vioque J, et al. Validity of the energy-restricted Mediterranean Diet Adherence Screener. *Clin Nutr.* 2021;40(8):4971–9.
27. Saitz R, Horton NJ, Sullivan LM, Moskowitz MA, Samet JH. Addressing alcohol problems in primary care: a cluster randomized, controlled trial of a systems intervention. The screening and intervention in primary care (SIP) study. *Ann Intern Med.* 2003 Mar;138(5):372–82.
28. Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, et al. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol.* 1993 Jun;22(3):512–9.
29. Fernández-Ballart JD, Piñol JL, Zazpe I, Corella D, Carrasco P, Toledo E, et al. Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of

- Spain. Br J Nutr. 2010 Jun;103(12):1808–16.
30. Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, Wright M, Gomez-Gracia E. Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. Eur J Clin Nutr. 2004 Nov;58(11):1550–2.
  31. Vilagut G, Ferrer M, Rajmil L, Rebollo P, Permanyer-Miralda G, Quintana JM, et al. El Cuestionario de Salud SF-36 español: una década de experiencia y nuevos desarrollos . Vol. 19, Gaceta Sanitaria . scielo.es ; 2005. p. 135–50.
  32. Bradley C. The Well-being Questionnaire. In: Bradley C, editor. Handbook of Psychology and Diabetes: a guide to psychological measurement in diabetes research and practice. Chur; 1994.
  33. Bradley C. The 12-Item Well-Being Questionnaire: origins, current stage of development, and availability. Vol. 23, Diabetes care. United States; 2000. p. 875.
  34. Mercer SW, Fitzpatrick B, Guthrie B, Fenwick E, Grieve E, Lawson K, et al. The CARE Plus study - a whole-system intervention to improve quality of life of primary care patients with multimorbidity in areas of high socioeconomic deprivation: exploratory cluster randomised controlled trial and cost-utility analysis. BMC Med. 2016 Jun;14(1):88.
  35. Buysse DJ, Reynolds CF 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. Psychiatry Res. 1989 May;28(2):193–213.
  36. Adan A, Almirall H. Adaptation and standardization of a Spanish version of the morningness-eveningness questionnaire: Individual differences. Pers Individ Dif [Internet]. 1990;11(11):1123–30. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/019188699090023K>
  37. Molina L, Sarmiento M, Peñafiel J, Donaire D, Garcia-Aymerich J, Gomez M, et al. Validation of the Regicor Short Physical Activity Questionnaire for the Adult Population. PLoS One. 2017;12(1):e0168148.
  38. Upton J. Beck Depression Inventory (BDI) BT - Encyclopedia of Behavioral Medicine. In: Gellman MD, Turner JR, editors. New York, NY: Springer New York; 2013. p. 178–9.
  39. Garaulet M, Canteras M, Morales E, López-Guimera G, Sánchez-Carracedo D, Corbalán-Tutau MD. Validation of a questionnaire on emotional eating for use in cases of obesity: the Emotional Eater Questionnaire (EEQ). Nutr Hosp. 2012;27(2):645–51.
  40. Lobo A, Chamorro L, Luque A, Dal-Ré R, Badia X, Baró E. Validación de las versiones en español de la Montgomery-Asberg Depression Rating Scale y la Hamilton Anxiety Rating Scale para la evaluación de la depresión y de la ansiedad. Med Clin (Barc) [Internet]. 2002;118(13):493–9. Available from: URL\_WEBes-revista-medicina-clinica-2-articulo-validacion-versiones-espanol-montgomery-asberg-depression-13029223
  41. Rosa AR, Comes M, Torrent C, Solè B, Reinares M, Pachiarotti I, et al. Biological rhythm disturbance in remitted bipolar patients. Int J bipolar Disord. 2013;1:6.
  42. Peñate W. La escala de valoración del estado de ánimo (EVEA): análisis de la estructura factorial y de la capacidad para detectar cambios en estados de ánimo. Análisis y Modif Conduct. 2011;36(153–154):19–32.
  43. Miranda JP, Valencia RR. English and Spanish Versions of a Memory Test: Word-Length Effects Versus Spoken-Duration Effects. Hisp J Behav Sci [Internet]. 1997 May 1;19(2):171–81. Available from: URL\_HispJBehavSci-1997-19-2-171

from: <https://doi.org/10.1177/07399863970192005>

44. Golden CJ. Test de colores y palabras (Stroop). TEA Ediciones. 2005. 1–46 p.
45. José A. Carrión. Utilidad del Fibroscans para evaluar la fibrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol.* 2009;32(6):415–423. DOI: 10.1016/j.gastrohep.2009.01.178.