

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 491**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2010 PCT/US2010/002950**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11059490**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2010 E 10830319 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2499260**

54 Título: **Biomarcadores de envejecimiento cardiaco y métodos de uso**

30 Prioridad:

**10.11.2009 US 280879 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.11.2017**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)  
Avenue Nestlé 55  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**LI, QINGHONG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 641 491 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Biomarcadores de envejecimiento cardiaco y métodos de uso

## 5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional estadounidense N.º de serie 61/280879, presentada el 10 de noviembre de 2009.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

15 La invención se refiere, en general, al campo del soporte nutricional de la salud y la longevidad en animales. En particular, la invención proporciona un conjunto de biomarcadores de envejecimiento en el corazón, que comprende varios genes implicados en la ruta de señalización de Wnt. La invención proporciona, además, el uso de esos biomarcadores para identificar nutrientes y regímenes alimentarios para retrasar el envejecimiento cardiaco, y para la modulación de los propios genes para retrasar el envejecimiento cardiaco.

## 20 Descripción de la técnica relacionada

El envejecimiento de un organismo y sus órganos componentes es actualmente objeto de mucha atención en investigación biológica y medicinal. Las marcas distintivas del envejecimiento incluyen reducción de la función de células madre y progenitoras y un declive de la regeneración tisular (Rando, 2006, Nature 441: 1080-1086). Los tejidos envejecidos muestran resistencia intrínseca reducida a lesiones o daño. Las células madre y progenitoras residentes y circulantes son células no especializadas que son críticas para reparaciones en curso de tejidos lesionados. Esta función regenerativa disminuye a medida que el tejido envejece. Se ha postulado que la disfunción de células madre y progenitoras pueden contribuir al envejecimiento y la enfermedad.

30 Informes recientes han descrito una conexión entre la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina y el envejecimiento de células madre (véase, por ejemplo, White y col., 2007, Current Biology 17(21): R923-925; Brack y col., 2007, Science 317: 807-810; Liu y col., 2007, Science 317: 803-806; Nusse, 2008, Cell Research 18: 523-527; Rando, 2006, más arriba). La beta-catenina es un mediador clave de la ruta de señalización de Wnt (Willert & Nusse, 1998, Current Opinion in Genetics & Development 8: 95-102; Nusse, 2008, más arriba). Cuando una proteína Wnt se une a sus receptores en la membrana celular, se desencadena una cadena de reacciones bioquímicas dentro de la célula. La cascada de señalización pasa eventualmente al interior del núcleo mediante beta-catenina, que depende de la señal de Wnt desde el citosol al núcleo para regular la expresión génica con otras proteínas nucleares (Huelsen & Birchmeier, 2001, Curr. Op. Genet. & Devel. 11: 547-553).

40 Se ha descrito que la señalización de Wnt aumentaba en diversos tejidos y órganos de modelos animales de envejecimiento acelerado (Liu y col., 2007, más arriba). Se describió que la exposición continua a Wnt causa senescencia celular. Análogamente, se ha descrito un aumento de la señalización de Wnt en células madre de músculo esquelético envejecido (Brack y col., 2007, más arriba). Además, se describió que la señalización de Wnt promueve la conversión de miógena a fibrógena de células madre de músculo y la inhibición de esta señal preservó el destino miógeno.

50 En el corazón, Deb y col., describieron que antagonizar la señalización de Wnt con la proteína secretada y relacionada con Frizzled 2 (SFRP2), un antagonista de Wnt extracelular, inhibía la diferencia y mantenía a las progenitoras cardíacas embrionarias y adultas en un estado indiferenciado (Deb y col., 2008, Stem Cells 26: 35-44).

Esos investigadores, por lo tanto, formularon la hipótesis de que la señalización de Wnt aumenta con el envejecimiento y esta señalización impulsa a las células madre y progenitoras cardíacas a linaje fibrógeno (Deb, 2008, Research Proposal Summary - New Scholar Award in Aging, Ellison Medical Foundation at URL [ellisonfoundation.org/](http://ellisonfoundation.org/)). Ashton y col., describieron regulación negativa de la ruta de señalización de Wnt en un corazón "envejecido" frente a joven. (Ashton y col., 2005, Experimental Gerontology 41: 189-204), pero en ese estudio no se describió la expresión de beta-catenina. Además, incluso aunque se ha mostrado que las células progenitoras cardíacas funcionalmente competentes alcanzan un máximo a la edad de 20 meses en ratones (Gonzales y col., 2008, Circulation Research 102: 597-606), los ratones en el grupo "envejecido" del estudio de Ashton y col., variaban en edad entre 16-18 meses. De este modo, los ratones usados en el estudio de Ashton y col., no eran individuos verdaderamente envejecidos.

65 La restricción de la ingesta calórica muy por debajo de niveles *ad libitum* ha demostrado aumentar la esperanza de vida, reducir o retardar la aparición de muchas afecciones asociadas a la edad, mejorar la resistencia al estrés y decelerar el declive funcional en numerosas especies animales, incluyendo mamíferos tales como roedores y primates. De hecho, se han iniciado ensayos clínicos para evaluar el efecto promotor de la longevidad de la restricción calórica (RC) en seres humanos. Pero en seres humanos y animales por igual, parece improbable que la

RC sea una estrategia viable para aumentar la longevidad en la mayoría de los individuos, debido al grado y la duración de restricción requeridos. Por esta razón, la investigación se ha centrado en la identificación de sustancias, por ejemplo, agentes farmacéuticos, sustancias nutricionales y similares, capaces de imitar el efecto de la RC sin un cambio sustancial en la ingesta alimentaria.

5 Se han dirigido esfuerzos a identificar agentes que puedan imitar uno o más de los efectos fisiológicos o bioquímicos de la RC (por ejemplo, Barger y col., 2008, PLoS ONE 3(6): e2264. doi:10.1371/journal.pone.0002264), o que puedan imitar el perfil de expresión génica asociado con RC en ciertos tejidos y órganos (por ejemplo, Spindler, patente de Estados Unidos 6.406.853; publicación de patente de Estados Unidos 2003/0124540; Barger y col., 2008, más arriba). En relación con esta última, se han desvelado métodos para analizar genes asociados con RC y para explorar miméticos de RC basados en el perfilado de la expresión génica (Spindler y col., publicaciones de patente de Estados Unidos 2004/0180003, 2004/0191775 y 2005/0013776; Pan y col., publicación de patente de Estados Unidos 2007/0231371).

15 Se ha descrito que una serie de sustancias interactúan con la señalización de beta-catenina y/o Wnt en diversos sistemas celulares y tisulares no cardíacos, incluyendo: alginato (Dettmar y col., 2007, Biomater Sci Polym Ed 18: 317-333), apigenina (Shukla y col., 2007, Cancer Res. 67: 6925-6935), ácido ascórbico (Quintanilla y col., 2005, J Biol Chem 280: 1 1615-11625), curcumina (Mahmoud y col., 2000, Carcinogenesis 21: 921-927), flavanona (Park y col., 2005, Biochem Biophys Res Commun 331: 1222-1228), genisteína (Guo y col., 2002, Am J Physiol Cell Physiol 283: C722-C734), ácido hialurónico (Bourguignon y col., 2007, J Biol Chem 282: 1265-1280), magnesio (Caveda y col., 1996, J Clin Invest 98: 886-893), ácido monooleil fosfatídico (Malbon, 2005, Sci STKE 292: pe35), naringenina (Lee y col., 2005, Biochem Biophys Res Commun 335: 771-776), óxido nítrico (nitroglicerina) (Prévotat y col., 2006, Gastroenterology 131: 1142-1152), quercetina (van Erk y col., 2005, Eur J Nutr 44: 143-556), resveratrol (Hope y col., 2008, Mol Nutr Food Res 52: S52-S61), S-carbamilcisteína (Proweller y col., 2006, Cancer Res 66: 7438-7444), butirato de sodio (Abramova y col., 2006, J Biol Chem 281: 21040-21051), salicilato de sodio (Lee y col., 2003, Int J Oncol 23: 503-508), espermidina (Guo y col., 2002, Am J Physiol Cell Physiol 283: C722-734), esfingosina (Olsson y col., 2004, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287: G929-937), trolox (un derivado de la vitamina E) (Quintanilla y col., 2005, más arriba) y glucosa (Lin y col., 2006, J Am Soc Nephrol 17: 2812-2820). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales se describió que se producen dichas interacciones, y el efecto de dichas interacciones, no se entendieron bien en muchos casos.

Ashton y col., describieron algunos desplazamientos asociados a la edad en la transcripción de genes cardíacos y respuestas transcripcionales al estrés isquémico. Bajo esta luz, se describió que el envejecimiento está asociado con desplazamientos en la expresión génica cardiovascular coherentes con las características fenotípicas de corazones más viejos. Se describió, además, que la tolerancia reducida con la edad puede estar relacionada con la modificación de la señalización (particularmente WNT y TGF- $\beta$ ), y desplazamientos en la expresión de genes inmediatos tempranos, y genes importantes en el control de la muerte/supervivencia celular, angiogénesis y remodelación cardíaca (Ashton y col., 2006, Experimental Gerontology 41: 189-204).

40 Bodyak y col., describieron cierto perfilado de la expresión génica de los miocitos cardíacos de ratón envejecido.

Bajo esta luz, Bodyak y col., describieron que genes cuyos niveles de ARNm cambian con el envejecimiento en cardiomiocitos podrían afectar profundamente a cambios patológicos en el corazón (Bodyak y col., 2002, Nucleic Acids Research 30: 3788-3794).

45 A pesar de la disponibilidad de los enfoques resumidos anteriormente, sigue existiendo una necesidad de métodos más robustos, más rápidos y menos costosos para explorar agentes que puedan retrasar o invertir el proceso de envejecimiento, bien de todo el cuerpo o bien de tejidos y órganos específicos, para promover un envejecimiento saludable y aumentar la longevidad. La presente invención satisface estas necesidades.

## 50 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Por lo tanto, es un objetivo de la invención proporcionar métodos para medir el envejecimiento biológico de células o tejido cardíaco.

55 Es otro objetivo de la invención proporcionar un método para medir el efecto de una sustancia de ensayo sobre el perfil de expresión de uno o más genes expresados de forma diferencial en células y tejidos cardíacos de sujetos de edad avanzada, en comparación con sujetos jóvenes o una referencia estándar.

60 Uno o más de estos otros objetivos se consiguen usando combinaciones novedosas de polinucleótidos o polipéptidos que representan genes y segmentos de genes que se expresan de forma diferencial en células y tejidos cardíacos de sujetos envejecidos en comparación con sujetos jóvenes, en las que los genes están relacionados por su implicación en la ruta de señalización de Wnt en el corazón, por la disminución de su expresión en tejido cardíaco envejecido frente a joven, y por la inversión de dichas disminuciones asociadas a la edad mediante RC o mediante ingestión de resveratrol. Los polinucleótidos se usan para producir métodos para determinar el estado de polinucleótidos expresados de forma diferencial en tejidos seleccionados de sujetos de edad avanzada, en

comparación con sujetos jóvenes o una referencia estándar, que son útiles para alcanzar los objetivos identificados anteriormente, por ejemplo, para explorar sustancias para determinar si es probable que tengan un efecto antienvjecimiento en el corazón.

5 La invención se refiere a un método para explorar un agente o régimen con respecto a la capacidad de retrasar el envejecimiento cardíaco, que comprende las etapas de:

- 10 a) determinar un primer perfil de expresión génica midiendo productos de transcripción o de traducción de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en tejido cardíaco de un sujeto de edad avanzada en ausencia del agente o régimen;
- 15 b) determinar un segundo perfil de expresión génica midiendo productos de transcripción o de traducción de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en tejido cardíaco de un sujeto de edad avanzada en presencia del agente o régimen; y
- c) comparar el primer perfil de expresión génica con el segundo perfil de expresión génica, en el que un cambio en el segundo perfil de expresión génica indica que es probable que el material o régimen sea útil para retrasar el envejecimiento cardíaco cuando se administra a un individuo.

20 El método puede comprender, además, comparar al menos el segundo perfil de expresión génica con un perfil de expresión génica de referencia obtenido midiendo productos de transcripción o de traducción de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en tejido cardíaco de un sujeto joven o en tejido cardíaco de un sujeto de edad avanzada en presencia de una sustancia o régimen de referencia que se sabe que retrasa el envejecimiento cardíaco cuando se administra a un individuo; opcionalmente en el que la sustancia o régimen de referencia comprende restricción calórica o ingestión de resveratrol.

25 El método puede comprender en el que los genes son Dlg1, Magi3, Akt1, Dab2, Rac1, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1, Senp2, Smad3, Mark2, Ccnd1 o Pias4.

El método puede comprender en el que los genes son Dlg1, Magi3, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1 o Senp2.

30 El método puede comprender en el que los genes son Magi3, Ctnnb1 o Camk2d.

El método puede comprender en el que el gen es Ctnnb1.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

35 Definiciones

40 El término "envejecimiento" significa envejecimiento biológico o fisiológico de un organismo, órgano, tejido, o cualquier parte del mismo. Esto incluye el desarrollo de enfermedades asociadas a la edad en un organismo, órgano, tejido, o cualquier parte del mismo. Análogamente, "envejecimiento cardíaco" significa el envejecimiento biológico o fisiológico del corazón o cualquier parte del mismo, incluyendo el desarrollo de enfermedades asociadas a la edad en el corazón o cualquier parte del mismo. Se pretende que la referencia al corazón o cualquier otro órgano mencionado en el presente documento, incluya todas las células y tejidos que componen el corazón u otro órgano.

45 El término "animal" significa un ser humano u otro animal, incluyendo animales aviares, bovinos, caninos, equinos, felinos, hircanos, murinos, ovinos y porcinos. Cuando el término se usa en el contexto de la comparación de los sujetos de ensayo, los animales que se comparan son animales de la misma especie y, posiblemente, de la misma raza o estirpe. El término "animal no humano" puede usarse en el presente documento para referirse a todos los animales, excepto los seres humanos. Un "animal de compañía" es cualquier animal domesticado, e incluye, sin limitación, gatos, perros, conejos, cobayas, hurones, hámsteres, ratones, jerbos, caballos, vacas, cabras, ovejas, burros, cerdos, y similares. En particular, el animal es un ser humano o un animal de compañía, tal como un perro o un gato.

50 El término "anticuerpo" significa cualquier inmunoglobulina que se une a un antígeno específico, incluyendo anticuerpos de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El término incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, humanizados, heteroconjugados, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, quiméricos, biespecíficos, diacuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, y fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv, u otros fragmentos de unión al antígeno.

55 El término "matriz" significa una disposición ordenada de al menos dos sondas sobre un sustrato. Al menos una de las sondas es un control o estándar y al menos una de las sondas es una sonda de diagnóstico. La disposición de desde aproximadamente 40.000 sondas sobre un sustrato garantiza que el tamaño y la intensidad de señal de cada complejo etiquetado formado entre una sonda y un polinucleótido o polipéptido de muestra es individualmente distinguible.

La expresión "complejo de unión" se refiere a un complejo formado cuando un polipéptido en una muestra se une específicamente (tal como se define en el presente documento) a un socio de unión, tal como un anticuerpo o fragmento funcional del mismo.

5 "Restricción de calorías" o "restricción calórica" ("RC") se refieren a cualquier régimen alimentario bajo en calorías sin desnutrición. En general, la limitación es de calorías totales derivadas de carbohidratos, grasas y proteínas. La limitación es normalmente, aunque sin limitarse a, de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 40 % de la ingesta calórica con respecto a un consumo *ad libitum*.

10 Un "suplemento dietético" es un producto que está concebido para ser ingerido además de la dieta normal de un animal. Los suplementos dietéticos pueden estar en cualquier forma, por ejemplo, sólido, líquido, gel, comprimidos, cápsulas, polvo, y similares. Preferentemente, se proporcionan en formas de dosificación convenientes. Se desvela que se proporcionan en envases de consumo a granel tales como polvos o líquidos a granel. Se desvela que se proporcionan suplementos en cantidades a granel para ser incluidos en otros artículos alimentarios, tales como  
15 aperitivos, golosinas, suplementos en barra, bebidas y similares.

La expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad de un compuesto, material, composición, medicamento, u otro material, o a las condiciones de un régimen, tal como un régimen alimentario o de ejercicio, que es eficaz para conseguir un resultado biológico particular, tal como invertir o retrasar el envejecimiento en un tejido seleccionado tal como el corazón, tal como se describe en el presente documento.  
20

El término "expresión", por ejemplo, "expresión génica" significa la transcripción de un gen para producir ARNm, y la traducción del ARNm para producir una proteína. Un aumento en la tasa de transcripción o traducción, o un aumento en la producción de un producto de transcripción o traducción, por ejemplo, ARNm o proteína, se incluye en las expresiones "expresión génica aumentada", "expresión génica regulada positivamente", y similares. Análogamente, una disminución de la tasa de transcripción o traducción, o una disminución de la producción de un producto de transcripción o traducción, por ejemplo, ARNm o proteína, se incluye en las expresiones "expresión génica reducida", "expresión génica regulada negativamente", y similares. Las expresiones "modulación de la expresión génica", "que afecta a la expresión génica", y similares, se refieren a aumentar o reducir la expresión génica. La expresión "expresión diferencial" o "expresado de forma diferencial" significa expresión génica aumentada o regulada positivamente, o expresión génica reducida o regulada negativamente, según lo detectado mediante la ausencia, presencia, o al menos un cambio de 1,2 veces en la cantidad de ARN mensajero transcrito o proteína traducida en una muestra.  
25  
30

Administración "prolongada", tal como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a periodos que superan un mes. Se contemplan periodos de más de dos, tres o cuatro meses. También están incluidos periodos más prolongados que incluyen más de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 meses. También están incluidos periodos que superan 11 meses o 1 año. El uso de periodos más largos que se prolongan más de 1, 2, 3 o más años también están contemplados en el presente documento. En el caso de ciertos animales, está previsto que al animal se le administraran sustancias identificadas mediante los presentes métodos de forma regular. "De forma regular", "administración regular" y/o "ingestión regular", tal como se usa en el presente documento, se refiere a administración al menos semanalmente. Se contempla la administración más frecuente, tal como dos o tres veces por semana. También se incluyen regímenes que comprenden administración al menos una vez, dos veces, tres veces o más al día. Cualquier frecuencia de dosificación, independientemente de si se indica como ejemplo expresamente en el presente documento, se considera útil. El experto en la materia apreciará que la frecuencia de dosificación estará en función de la sustancia que está siendo administrada, y algunas composiciones pueden requerir una administración más o menos frecuente para mantener un efecto bioquímico, fisiológico o de expresión génica deseado, concretamente efectos que incluyen uno o más de ingesta de alimentos, saciedad, metabolismo de lípidos, y utilización de grasas, y el perfil de expresión génica asociado con ellos. La expresión "de forma regular prolongada," "administración regular prolongada" y/o "ingestión regular prolongada", tal como se usa en el presente documento, se refiere a administración prolongada de una sustancia de forma regular.  
35  
40  
45  
50

El término "alimento" o "composición alimentaria" significa una composición que está destinada al consumo por un animal, incluyendo un ser humano, y le proporciona nutrición. Un "producto alimentario formulado para consumo humano" es cualquier composición destinada específicamente para ingestión por un ser humano. "Alimentos para mascotas" son composiciones destinadas al consumo por mascotas, preferentemente por animales de compañía.  
55

Un "alimento para mascotas completo y nutricionalmente equilibrado", es uno que contiene todos los nutrientes requeridos conocidos para el receptor o consumidor pretendido del alimento, en cantidades y proporciones apropiadas, basándose por ejemplo en recomendaciones de autoridades reconocidas en el campo de la nutrición de animales de compañía. Dichos alimentos son, por lo tanto, capaces de servir como una fuente exclusiva de ingesta alimentaria para mantener la vida o promover la producción, sin la adición de fuentes nutricionales suplementarias. Las composiciones de alimento para mascotas nutricionalmente equilibradas son ampliamente conocidas y ampliamente usadas en la técnica.  
60  
65

El término "fragmento" significa (1) una secuencia de oligonucleótidos o polinucleótidos que es una parte de una secuencia completa y que tiene la misma o una actividad similar para un uso particular que la secuencia de polinucleótidos completa o (2) una secuencia peptídica o polipeptídica que es una parte de una secuencia completa y que tiene la misma o una actividad similar para un uso particular que la secuencia polipeptídica completa. Dichos fragmentos pueden comprender cualquier número de nucleótidos o aminoácidos considerado adecuado para un uso particular. Generalmente, los fragmentos de oligonucleótidos o polinucleótidos contienen al menos aproximadamente 10, 50, 100 o 1000 nucleótidos y los fragmentos de polipéptidos contienen al menos aproximadamente 4, 10, 20 o 50 aminoácidos consecutivos de la secuencia completa. El término abarca variantes de polinucleótidos y polipéptidos de los fragmentos.

El término "gen" o "genes", significa un segmento completo o parcial de ADN implicado en la producción de un polipéptido, incluyendo regiones que preceden y que siguen a la región codificante (líder y final) y secuencias intermedias (intrones) entre segundos codificantes individuales (exones). El término abarca cualquier secuencia de ADN que hibrida con el resto de secuencias codificantes de genes.

La expresión "producto génico" significa el producto de la transcripción de un gen, tal como ARNm o derivados del mismo (por ejemplo, ADNc), o traducción de un transcrito génico. La expresión "producto génico" se refiere, en general, al producto de traducción, que es una proteína. La expresión "producto génico" puede usarse de forma intercambiable con el término "proteína" o "polipéptido" en el presente documento.

El término "homólogo" significa (1) un polinucleótido, incluyendo polinucleótidos de la misma o de especies animales diferentes, que tiene más del 30 %, 50 %, 70 % o 90 % de afinidad de secuencia con un polinucleótido de referencia, y que tiene las mismas o sustancialmente las mismas propiedades y que realiza la misma o sustancialmente la misma función que el polinucleótido de referencia, o que tiene la capacidad de hibridar específicamente con un polinucleótido de referencia en condiciones rigurosas o (2) un polipéptido, incluyendo polipéptidos de la misma o de especies animales diferentes, que tiene más del 30 %, 50 %, 70 % o 90 % de similitud de secuencia con un polipéptido de referencia y que tiene las mismas o sustancialmente las mismas propiedades y que realiza la misma o sustancialmente la misma función que el polipéptido de referencia, o que tiene la capacidad de unirse específicamente a un polipéptido de referencia. Cuando se hace referencia a fragmentos de secuencias codificantes de longitud completa, la función de esos fragmentos puede ser simplemente codificar una parte seleccionada de un polipéptido de cierta secuencia, o ser de secuencia adecuadamente similar para hibridar con otro fragmento de polinucleótido que codifica ese polipéptido. Cuando se hace referencia a fragmentos de polipéptidos, la función de esos fragmentos puede ser simplemente formar un epítopo adecuado para la generación de un anticuerpo. La similitud de secuencia de dos secuencias de polipéptidos o de dos secuencias de polinucleótidos se determina usando métodos conocidos por expertos en la materia, por ejemplo, el algoritmo de Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 87: 2264-2268 (1990)). Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col., 1990, (J. Mol. Biol. 215: 403-410). Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped Blast, tal como se describe en Altschul y col., 1997, (Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

La expresión "complejo de hibridación" significa un complejo que se forma entre polinucleótidos de muestra cuando las purinas de un hidrógeno de un polinucleótido se unen con las pirimidinas del polinucleótido complementario, por ejemplo, pares de bases 5'-A-G-T-C-3' con 3'-T-C-A-G-5'. El grado de complementariedad y el uso de análogos de nucleótidos afectan a la eficiencia y rigurosidad de las reacciones de hibridación.

La expresión "junto con" significa que un fármaco, alimento, u otra sustancia es administrado a un animal (1) conjuntamente en una composición, particularmente composición alimentaria, o (2) por separado a la misma o una frecuencia diferente usando las mismas o vías de administración diferentes a aproximadamente el mismo tiempo o periódicamente. "Periódicamente" significa que la sustancia se administra en un régimen de dosificación aceptable para una sustancia específica. "Aproximadamente al mismo tiempo" generalmente significa que la sustancia (alimento o fármaco) se administra al mismo tiempo o en el plazo de aproximadamente 72 horas una respecto a otra. "Junto con" incluye específicamente esquemas de administración en los que sustancias tales como fármacos se administran durante un periodo prescrito y composiciones de la invención se administran indefinidamente.

El término "individuo" cuando se refiere a un animal significa un animal individual de cualquier especie o clase. Este término se usa de forma intercambiable con el término "sujeto".

El término "polinucleótido" u "oligonucleótido" significa un polímero de nucleótidos. El término abarca moléculas de ADN y ARN (incluyendo ADNc y ARNm), mono o bicatenarias y, si son monocatenarias, su secuencia complementaria en forma lineal o circular. El término también abarca fragmentos, variantes, homólogos y alelos, según sea apropiado para las secuencias, que tienen las mismas o sustancialmente las mismas propiedades y realizan la misma o sustancialmente la misma función que la secuencia original. En particular, el término abarca homólogos de diferentes especies, por ejemplo, un ratón y un perro o un gato. Las secuencias pueden ser completamente complementarias (sin emparejamientos erróneos) cuando se alinean o pueden tener hasta aproximadamente un 30 % de emparejamientos erróneos de secuencia. Opcionalmente, para polinucleótidos, la

cadena contiene de aproximadamente 50 a 10.000 nucleótidos, más preferentemente de aproximadamente 150 a 3.500 nucleótidos. Opcionalmente, para oligonucleótidos, la cadena contiene de aproximadamente 2 a 100 nucleótidos, más preferentemente de aproximadamente 6 a 30 nucleótidos. El tamaño exacto de un polinucleótido u oligonucleótido dependerá de diversos factores y de la aplicación y el uso particulares del polinucleótido u oligonucleótido. El término incluye polímeros de nucleótidos que se sintetizan y que se aíslan y se purifican a partir de fuentes naturales. El término "polinucleótido" es inclusivo de "oligonucleótido".

El término "polipéptido", "péptido" o "proteína" significa un polímero de aminoácidos. El término abarca polímeros de origen natural y de origen no natural (sintéticos) y polímeros en los que miméticos químicos artificiales son sustituidos por uno o más aminoácidos. El término también abarca fragmentos, variantes y homólogos que tienen las mismas o sustancialmente las mismas propiedades y realizan la misma o sustancialmente la misma función que la secuencia original. El término abarca polímeros de cualquier longitud, opcionalmente polímeros que contienen de aproximadamente 2 a 1000 aminoácidos, más específicamente de aproximadamente 5 a 500 aminoácidos. El término incluye polímeros de aminoácidos que se sintetizan y que se aíslan y se purifican a partir de fuentes naturales.

El término "sonda" significa (1) un oligonucleótido o polinucleótido, bien ARN o bien ADN, ya sea de origen natural como en una digestión con enzima de restricción purificada o producido sintéticamente, que es capaz de hibridar con o hibridar específicamente con un polinucleótido con secuencias complementarias a la sonda o (2) un compuesto o sustancia, incluyendo un péptido o polipéptido, capaz de unirse específicamente a una proteína o fragmento de proteína particular hasta la exclusión sustancial de otras proteínas o fragmentos de proteína. Una sonda oligonucleotídica o polinucleotídica puede ser bien mono o bien bicatenaria. La longitud exacta de la sonda dependerá de muchos factores, incluyendo temperatura, fuente y uso. Por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, una sonda oligonucleotídica normalmente contiene aproximadamente de 10 a 100, 15 a 50, o 15 a 25 nucleótidos. En ciertas aplicaciones de diagnóstico, una sonda polinucleotídica contiene aproximadamente 100-1000, 300-600, nucleótidos, preferentemente aproximadamente 300 nucleótidos. Las sondas en el presente documento se seleccionan para ser "sustancialmente" complementarias a diferentes cadenas de una secuencia diana particular. Esto significa que las sondas deben ser suficientemente complementarias para hibridar específicamente o hibridar con sus secuencias diana respectivas en un conjunto de condiciones predeterminadas. Por lo tanto, no es necesario que la secuencia de la sonda refleje la secuencia complementaria exacta de la diana. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario puede unirse al extremo 5' o 3' de la sonda, con el resto de la secuencia de la sonda siendo complementario a la secuencia diana. Como alternativa, bases no complementarias o secuencias más largas pueden intercalarse en la sonda si la secuencia de la sonda tiene suficiente complementariedad con la secuencia del polinucleótido diana para hibridar específicamente con el polinucleótido diana. Una sonda peptídica o polipeptídica puede ser cualquier molécula a la que la proteína o el péptido se une específicamente, incluyendo ADN (para proteínas de unión a ADN), anticuerpos, receptores de la membrana celular, péptido, cofactores, lectinas, azúcares, polisacáridos, células, membranas celulares, orgánulos y membranas de orgánulos.

El término "muestra" significa cualquier tejido o fluido animal que contiene, por ejemplo, polinucleótidos, polipéptidos, anticuerpos, metabolitos, y similares, incluyendo células y otro tejido que contiene ADN y ARN. Los ejemplos incluyen adiposo, sangre, cartílago, conectivo, epitelial, linfoides, músculo, nervioso, esputo, y similares. Una muestra puede ser sólida o líquida y puede ser ADN, ARN, ADNc, fluidos corporales tales como sangre u orina, células, preparaciones celulares o fracciones solubles o alícuotas de medios de las mismas, cromosomas, orgánulos, y similares.

La expresión "envase único" significa que los componentes de un kit están asociados físicamente en o con uno o más recipientes y son considerados una unidad para fabricación, distribución, venta o uso. Los recipientes incluyen, aunque sin limitarse a, bolsas, cajas, botellas, envases retráctiles, componentes grapados o fijados de otro modo, o combinaciones de los mismos. Un envase único puede ser recipientes de composiciones alimentarias individuales asociadas físicamente, de modo que se consideran una unidad para fabricación, distribución, venta o uso.

La expresión "se unen específicamente" significa una interacción especial y precisa entre dos moléculas que depende de su estructura, particularmente sus grupos secundarios moleculares. Por ejemplo, la intercalación de una proteína reguladora en el surco mayor de una molécula de ADN, la formación de puentes de hidrógeno a lo largo de la estructura principal entre dos ácidos nucleicos monocatenarios, o la unión entre un epítipo de una proteína y un agonista, antagonista o anticuerpo.

La expresión "hibridan específicamente" significa una asociación entre dos polinucleótidos bicatenarios de secuencia suficientemente complementaria para permitir dicha hibridación en condiciones predeterminadas usadas generalmente en la técnica (algunas veces denominada "sustancialmente complementaria"). Por ejemplo, la expresión puede referirse a hibridación de una sonda polinucleotídica con una secuencia suficientemente complementaria contenida dentro de una molécula de ADN o ARN monocatenaria de acuerdo con un aspecto de la invención, hasta la exclusión sustancial de la sonda polinucleotídica con polinucleótidos monocatenarios de secuencia no complementaria.

El término "estándar" o "referencia" significa (1) una muestra de control que contiene tejido de un individuo al que se le administró una sustancia de control o de referencia, o ninguna sustancia, en comparación con una muestra que contiene tejido de un individuo al que se le administró una sustancia de ensayo, por ejemplo, para determinar si la sustancia de ensayo causa expresión génica diferencial, según sea apropiado para el contexto de su uso.

5 La expresión "condiciones rigurosas" significa (1) hibridación en formamida al 50 % (vol/vol) con albúmina de suero bovino al 0,1 %, Ficoll al 0,1 %, polivinilpirrolidona al 0,1 %, tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C, (2) hibridación en formamida al 50 %, 5x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1 %, 5x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1 %, y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C; con lavados a 42 °C en 0,2x SSC y SDS al 0,1 % o lavados con NaCl 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0,1 % a 50 °C o procedimientos similares que emplean agentes de lavado a baja fuerza iónica y alta temperatura similares y agentes desnaturalizantes similares.

15 El término "variante" significa (1) una secuencia de polinucleótidos que contiene cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, delección o adición de uno o más nucleótidos desde o a una secuencia de polinucleótidos y que tiene las mismas o sustancialmente las mismas propiedades y realiza la misma o sustancialmente la misma función que la secuencia original y (2) una secuencia polipeptídica que contiene cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, delección o adición de uno o más aminoácidos desde o a una secuencia polipeptídica y que tiene las mismas o sustancialmente las mismas propiedades y realiza la misma o sustancialmente la misma función que la secuencia original. El término incluye, por lo tanto, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y variantes alélicas e incluye sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas en polipéptidos. El término también abarca derivatización química de un polinucleótido o polipéptido y sustitución de nucleótidos o aminoácidos con nucleótidos o aminoácidos que no se producen de forma natural, según sea apropiado.

25 La expresión "envase virtual" significa que los componentes de un kit están asociados mediante instrucciones en uno o más componentes de kit físicos o virtuales que instruyen al usuario sobre cómo obtener los otros componentes, por ejemplo, en una bolsa que contiene un componente e instrucciones que instruyen al usuario para que visite un sitio web, contacte con un mensaje grabado, vea un mensaje visual, o contacte con un cuidador o instructor para obtener instrucciones sobre cómo usar el kit.

35 Las expresiones "señalización de Wnt", "ruta de Wnt" y similares se refieren a una ruta de transducción de señales bien conocida que implica una compleja red de genes y sus proteínas codificadas implicadas en la embriogénesis, así como en procesos fisiológicos normales en animales adultos. Estos genes y proteínas, algunas veces denominadas en el presente documento como genes o proteínas "relacionadas con Wnt", producen o regulan la producción de moléculas de señalización de Wnt, sus interacciones con receptores en células diana y las respuestas fisiológicas de células diana que resultan de la exposición de células a los ligandos de Wnt extracelulares.

40 "Joven" se refiere, en general, a un individuo adulto joven, es decir, madurado pasada la pubertad o adolescencia, tal como sería definido mediante especie, o mediante estirpe, raza o grupo étnico dentro de una especie, de acuerdo con parámetros conocidos. "De edad avanzada" o "viejo" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un individuo que está física o cronológicamente dentro del último 30 % de su esperanza de vida media, según lo determinado mediante especie, o mediante estirpe, raza o grupo étnico dentro de una especie, de acuerdo con parámetros conocidos.

45 En el presente documento se usan intervalos como descripción abreviada para evitar tener que enumerar y describir todos y cada uno de los valores dentro del intervalo. Puede seleccionarse cualquier valor apropiado dentro del intervalo, donde sea apropiado, como el valor superior, el valor inferior, o el extremo del intervalo.

50 Tal como se usa en el presente documento, la forma singular de una palabra incluye el plural, y viceversa, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, las referencias "un", "uno" y "el" son generalmente inclusivas de los plurales de los términos respectivos. Por ejemplo, referencia a "un individuo", "un animal", "un método" o "una enfermedad" incluye una pluralidad de dichos "sujetos" "animales", "métodos" o "enfermedades".

55 Análogamente, las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" deben interpretarse de forma inclusiva en lugar de en forma exclusiva. Del mismo modo, debe interpretarse que los términos "incluyen", "incluyendo" y "o" son todos inclusivos, a menos que dicha construcción esté claramente prohibida desde el contexto. Análogamente, el término "ejemplos," particularmente cuando viene seguido por una lista de términos, es simplemente ejemplar e ilustrativo y no debe considerarse que es exclusivo o exhaustivo.

60 La expresión "que comprende" pretende incluir realizaciones abarcadas por las expresiones "que consiste esencialmente en" y "que consiste en". Análogamente, la expresión "que consiste esencialmente en" pretende incluir realizaciones abarcadas por la expresión "que consiste en".

65 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos, términos de la técnica, y los acrónimos usados en el presente documento tienen los significados comúnmente entendidos por un experto en la materia en el



campo o campos de la invención, o en el campo o campos donde se usa el término. Aunque cualesquiera composiciones, métodos, artículos de fabricación, u otros medios o materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la puesta en práctica de la invención, las composiciones, métodos, artículos de fabricación, u otros medios o materiales preferidos se describen en el presente documento.

5 Todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones, artículos técnicos y/o académicos, y otras referencias citadas o mencionados en el presente documento, la descripción de esas referencias pretende simplemente resumir las afirmaciones hechas en las mismas. No se hace admisión de que cualquiera de dichas patentes, solicitudes de patente, publicaciones o referencias, o cualquier parte de las mismas, sean relevantes, material o técnica anterior. El  
10 derecho de cuestionar la exactitud y pertinencia de cualquier afirmación de dichas patentes, solicitudes de patente, publicaciones y otras referencias como relevante, material o de la técnica anterior está reservado específicamente.

La invención

15 Los muchos aspectos de la invención descritos en el presente documento surgen en parte del descubrimiento de los inventores de una disminución asociada a la edad de la expresión de varios genes que son determinantes positivos de la ruta de señalización de Wnt en el corazón. La observación se realizó en dos especies animales diferentes, lo que indica que la regulación negativa observada de la ruta de Wnt en corazón envejecido no es específico de especie. Notablemente, la beta-catenina, un actor importante en la señalización de Wnt, también está regulado  
20 negativamente. Estas observaciones contrastan con muchos de los descubrimientos pasados y recientes de que la señalización de Wnt aumenta con el envejecimiento. Los inventores también descubrieron que intervenciones nutricionales, tales como restricción de calorías (RC) y suplementación con resveratrol, que se sabe que retrasan el proceso de envejecimiento en general, suprimían la disminución asociada a la edad de la expresión génica de la ruta de Wnt, y aumentaban la expresión de muchos de los genes de Wnt de vuelta a niveles observados en tejido  
25 cardiaco de animales jóvenes.

De acuerdo con los descubrimientos descritos anteriormente, se desvela que la ruta de señalización de Wnt se monitoriza o manipula midiendo o modulando la expresión de uno o más genes implicados en la ruta, que los inventores han descubierto que están regulados negativamente en tejido cardiaco envejecido. Dichos genes incluyen Dlg1, Magi3, Akt1, Dab2, Rac1, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1, Senp2, Smad3, Mark2, Ccnd1 y Pias4. Polinucleótidos y fragmentos de los mismos que forman estos genes, así como sus proteínas codificadas y fragmentos, pueden usarse, por ejemplo, en ensayos de diagnóstico o pronóstico para medir la edad biológica de células o tejidos  
30 cardiacos, o ensayos útiles para explorar compuestos de ensayo con respecto a su eficacia para retrasar el envejecimiento cardiaco, o en la manipulación de la señalización de Wnt en el corazón para retrasar el envejecimiento cardiaco.

Se desvela que puede medirse la expresión de al menos un gen expresado de forma diferencial. Se desvela que puede medirse la expresión de dos o más genes expresados de forma diferencial, proporcionando un patrón de expresión génica o perfil de expresión génica.

40 Se desvela que pueden medirse cambios en la expresión génica de una o ambas de dos maneras: (1) midiendo la transcripción a través de la detección de ARNm producido por un gen particular; y (2) midiendo la traducción a través de la detección de proteína producida por un transcrito particular.

45 La expresión reducida o aumentada puede medirse a nivel del ARN usando cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, PCR (incluyendo, sin limitación, RT-PCR y qPCR), protección contra ARNasa, transferencia de Northern, micromatriz, macromatriz, y otros métodos de hibridación. Los genes que se ensayan o se interrogan de acuerdo con la presente invención están normalmente en forma de ARNm o ARNm transcrito de forma inversa. Los genes pueden clonarse y/o amplificarse.

50 La propia clonación no parece predisponer la representación de genes dentro de una población. Sin embargo, puede ser preferible usar ARN poliA+ como fuente, dado que puede usarse con menos etapas de procesamiento.

Por lo tanto, se desvela una combinación que comprende una pluralidad de polinucleótidos o proteínas expresadas a partir de ellos que se expresan de forma diferencial en tejido cardiaco en sujetos de edad avanzada en comparación con sujetos jóvenes, en la que los polinucleótidos se seleccionan entre dos o más genes implicados en la señalización de Wnt en el tejido cardiaco, o fragmentos de los mismos. Se desvela que los genes se seleccionan entre Dlg1, Magi3, Akt1, Dab2, Rac1, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1, Senp2, Smad3, Mark2, Ccnd1 y Pias4. Se desvela que los genes se seleccionan entre Dlg1, Magi3, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1 y Senp2. Se desvela que los genes son Magi3, Ctnnb1 y Camk2d. Se desvela que la expresión diferencial se invierte mediante RC o mediante ingestión de resveratrol, que puede administrarse como parte de un régimen alimentario, por ejemplo, como un aditivo a alimento o pienso, o como un suplemento dietético.

65 Se desvela que la combinación comprende dos o más polinucleótidos o proteínas expresados a partir de los polinucleótidos. Preferentemente, la combinación comprende una pluralidad de polinucleótidos o proteínas expresadas a partir de polinucleótidos, y puede comprender hasta todos los polinucleótidos o proteínas que

representan todos los genes enumerados anteriormente, o fragmentos de los mismos. Cuando la combinación comprende uno o más fragmentos, los fragmentos pueden ser de cualquier tamaño que conserve las propiedades y la función del polinucleótido o proteína original, preferentemente de aproximadamente el 30 %, 60 % o 90 % del original.

5 Los polinucleótidos y proteínas pueden ser de cualquier animal; por ejemplo, seres humanos o animales de compañía, tales como perros o gatos. Homólogos de los polinucleótidos o proteínas de diferentes especies animales son obtenibles mediante extracción de información estándar y métodos moleculares bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, el nombre, o descripción de la función de un gen o proteína pueden introducirse en una de varias bases de datos disponibles públicamente, lo que generará una lista de fuentes que proporcionan información sobre ese gen de diferentes especies, incluyendo información de secuencia. Una base de datos de ese tipo es la base de datos de "Information Hyperlinked over Proteins (iHOP)", que es accesible en internet mediante la dirección url: [ihop-net.org](http://ihop-net.org). Como alternativa, un número de acceso de base de datos pública de un gen o proteína conocida puede utilizarse para acceder a información de secuencia para ese gen o proteína y para buscar homólogos u ortólogos en otras especies usando una búsqueda con comparación de secuencias. Por ejemplo, el número de acceso del GenBank de un gen o proteína de ratón puede introducirse en la base de datos del National Institutes of Health's National Center for Biotechnology Information (NCBI), accediendo de este modo a secuencias de ADN o polipeptídicas para ese gen de ratón. Usando la misma base de datos, puede realizarse una búsqueda con BLAST en la secuencia de ADN o de proteína de ratón, o fragmentos de los mismos de longitud suficiente para definir el gen o proteína, para identificar secuencias de suficiente homología de otras especies, por ejemplo, una especie canina. Los números de acceso de las secuencias de las otras especies de interés pueden introducirse a continuación en la base de datos para obtener información relativa a esas secuencias de nucleótidos o proteínas de longitud completa, así como otra información descriptiva.

25 Se desvela una composición que comprende sondas para detectar expresión génica diferencial en tejido cardiaco en sujetos de edad avanzada en comparación con sujetos jóvenes, en la que las sondas detectan dos o más genes o productos génicos implicados en la señalización de Wnt en el tejido cardiaco. Se desvela que los genes se seleccionan entre *Dlgh1*, *Magi3*, *Akt1*, *Dab2*, *Rac1*, *Ctnnb1*, *Camk2d*, *Mapk1*, *Senp2*, *Smad3*, *Mark2*, *Ccnd1* y *Pias4*. Se desvela que los genes se seleccionan entre *Dlgh1*, *Magi3*, *Ctnnb1*, *Camk2d*, *Mapk1* y *Senp2*. Se desvela que los genes son *Magi3*, *Ctnnb1* y *Camk2d*. Se desvela que la expresión diferencial se invierte mediante RC o mediante ingestión de resveratrol, que puede administrarse como parte de un régimen alimentario, por ejemplo, como un aditivo a alimento o pienso, o como un suplemento dietético.

35 Las sondas pueden comprender polinucleótidos u oligonucleótidos que hibridan específicamente con los genes relacionados con Wnt, o fragmentos de los mismos. Como alternativa, pueden comprender agentes de unión a polipéptidos que se unen específicamente a polipéptidos producidos por la expresión de los genes relacionados con Wnt, o fragmentos de los mismos. Se desvela que los agentes de unión a polipéptidos son anticuerpos, y también se desvela que son anticuerpos monoclonales. Se desvela que las sondas hibridan o se unen específicamente a polinucleótidos o polipéptidos humanos, caninos o felinos.

40 Normalmente, la composición comprende una pluralidad de sondas, en general aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o más sondas para detectar polinucleótidos o proteínas, o fragmentos de los mismos, según sea apropiado para una especie y un uso particulares. Será entendido por el experto en la materia que pueden utilizarse múltiples sondas diferentes para una única diana o proteína, para perfeccionar la sensibilidad o exactitud de un ensayo que utiliza las sondas. Por ejemplo, pueden emplearse varias sondas oligonucleotídicas, que hibridan específicamente con diferentes secuencias en un polinucleótido diana. Del mismo modo, pueden utilizarse varios anticuerpos, específicos inmunológicamente para diferentes epítomos en una proteína diana.

50 Una o más sondas oligonucleotídicas o polinucleotídicas para interrogar una muestra pueden prepararse usando la información de secuencia de cualquiera de los genes enumerados en el presente documento, de cualquier especie, tal como humana, canina o felina. Las sondas deben ser de suficiente longitud para hibridar específicamente de forma sustancialmente exclusiva con genes o transcritos complementarios apropiados. Se desvela que las sondas oligonucleotídicas serán de al menos aproximadamente 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 25 nucleótidos de longitud. Se desvelan sondas más largas de al menos aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 nucleótidos son deseables, y sondas más largas de aproximadamente 100 nucleótidos pueden ser adecuadas. Las sondas pueden comprender secuencias de longitud completa que codifican proteínas funcionales. Las sondas de ácido nucleico están hechas o se obtienen usando métodos conocidos por expertos en la materia, por ejemplo, síntesis *in vitro* a partir de nucleótidos, aislamiento y purificación a partir de fuentes naturales, o escisión enzimática de los polinucleótidos desvelados.

60 Complejos de hibridación que comprenden sondas de ácido nucleico hibridadas a un polinucleótido que comprende un gen relacionado con Wnt, pueden detectarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Se desvela que pueden usarse sondas de ácido nucleico inmovilizadas para la detección rápida y específica de polinucleótidos y sus patrones de expresión. Normalmente, una sonda de ácido nucleico está enlazada a un soporte sólido y un polinucleótido diana (por ejemplo, un gen, un producto de transcripción, un amplicón, o, de la forma más común, una mezcla amplificada) se hibrida a la sonda. Bien la sonda, o bien la diana, o ambos, puede etiquetarse, normalmente

65

con un fluoróforo u otro identificador, tal como estreptavidina. Donde la diana está etiquetada, la hibridación puede detectarse detectando fluorescencia unida. Donde la sonda está etiquetada, la hibridación se detecta normalmente mediante inactivación de la etiqueta. Donde tanto la sonda como la diana están etiquetados, la detección de la hibridación se realiza normalmente monitorizando un desplazamiento de color que resulta de la proximidad de las dos etiquetas unidas. Diversas estrategias de etiquetado, etiquetas, y similares, particularmente para aplicaciones basadas en fluorescencia, se conocen en la técnica.

Se desvela que las sondas comprenden agentes de unión a polipéptidos que se unen específicamente a polipéptidos, o fragmentos de los mismos, producidos mediante la expresión de uno o más de los genes enumerados en el presente documento, o fragmentos de los mismos. Dichas sondas de unión a proteínas pueden prepararse usando la información de secuencia disponible para cualquiera de las proteínas relacionadas con Wnt identificadas en el presente documento.

Técnicas de ensayo que pueden usarse para determinar niveles de una proteína en una muestra también son bien conocidas por los expertos en la materia. Dichos métodos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitivos, análisis por transferencia de Western y ensayos ELISA. En los métodos de ensayo que utilizan anticuerpos, anticuerpos tanto policlonales como monoclonal son adecuados para uso en la invención. Dichos anticuerpos pueden ser inmunológicamente específicos para una proteína particular, o un epítipo de la proteína, o un fragmento de proteína, tal como sería bien entendido por los expertos en la materia. Métodos de fabricación de anticuerpos policlonales y monoclonales inmunológicamente específicos para una proteína o péptido también se conocen bien en la técnica.

Se desvelan anticuerpos para la detección y cuantificación de proteínas producidas por la expresión de los genes descritos en el presente documento. Aunque pueden detectarse proteínas mediante inmunoprecipitación, separación por afinidad, análisis por transferencia de Western y similares, un método preferido utiliza metodología de tipo ELISA en la que el anticuerpo se inmoviliza sobre un soporte sólido y una proteína o péptido diana se expone al anticuerpo inmovilizado. Bien la sonda o bien la diana, o ambas, pueden estar etiquetadas. Diversas estrategias de etiquetado, etiquetas, y similares, se conocen en la técnica.

Se desvela que pueden utilizarse matrices de sondas oligonucleotídicas o polinucleotídicas, y que las matrices de anticuerpos u otras proteínas que se unen específicamente a los productos génicos expresados de forma diferencial.

Dichas matrices pueden fabricarse a medida de acuerdo con métodos conocidos, tales como, por ejemplo, síntesis *in-situ* sobre un soporte sólido o fijación de sondas presintetizadas a un soporte sólido mediante técnicas de microimpresión. Se desvela que matrices de sondas de unión a ácido nucleico o proteínas se fabrican a medida para detectar específicamente transcritos o proteínas producidas por dos o más de los genes o fragmentos de genes expresados de forma diferencial descritos en el presente documento.

Se desvelan métodos de ensayo que implican monitorizar cambios en la expresión génica. Se desvela que se proporciona un método para medir una edad biológica relativa de células o tejido cardiaco. El método comprende las etapas de: (a) determinar un perfil de expresión génica de ensayo midiendo los productos de transcripción o traducción de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en las células o tejido cardiaco; (b) comparar el perfil de expresión génica de ensayo con el perfil de expresión génica de referencia de células o tejido cardiaco equivalentes de edad biológica conocida; y (c) determinar a partir de la comparación la edad biológica relativa de las células o tejido cardiaco.

Se desvela que los genes relacionados con Wnt son *Dlgh1*, *Magi3*, *Akt1*, *Dab2*, *Rac1*, *Ctnnb1*, *Camk2d*, *Mapk1*, *Senp2*, *Smad3*, *Mark2*, *Ccnd1* o *Pias4*. Se desvela utilizar *Dlgh1*, *Magi3*, *Ctnnb1*, *Camk2d*, *Mapk1* o *Senp2*. Se desvela utilizar *Magi3*, *Ctnnb1* o *Camk2d*. Se desvela que se mide la expresión de un gen que codifica beta-catenina, por ejemplo, *Ctnnb1*.

Se desvela que el método se realiza en una población de células cultivadas, tal como se describe con más detalle en secciones a continuación. De forma más normal, el método se realiza en células o tejido de un animal. Se desvela que el método se usa para medir la edad biológica del corazón detectando la expresión diferencial de genes relacionados con Wnt de seres humanos o animales de compañía, de la forma más normal perros o gatos. Se desvela que las sondas están unidas a un sustrato, preferentemente en una matriz.

Se desvela que la comparación entre el perfil de expresión génica de ensayo y el perfil de referencia se realiza de forma relativamente contemporánea (es decir, células o tejido cardiaco de sujetos viejos y jóvenes). Se desvela que la referencia usada para comparación se basa en datos obtenidos previamente usando el método. Se desvela que las sondas son expuestas a una muestra para formar complejos de hibridación o de unión que son detectados y comparados con los de un estándar, que puede comprender información recopilada previamente correlativa a los niveles de expresión génica de Wnt con una edad biológica conocida de las células o tejido cardiaco. Las diferencias entre los complejos de hibridación o de unión de la muestra y el estándar indican expresión diferencial de polinucleótidos y, por lo tanto, genes expresados de forma diferencial en tejido del sujeto viejo frente al estándar, que puede comprender ARNm aislado previamente a partir de un sujeto joven u otro tipo de sujeto de referencia.

Métodos tales como los descritos anteriormente pueden ser útiles para implementar, facilitar, o guiar un régimen anti-envejecimiento, tales como RC y/o un régimen nutricional, o un régimen de ejercicio. Dichos métodos comprenden obtener una muestra de tejido cardíaco de un sujeto que se somete a dicho régimen. La muestra de tejido se analiza a continuación para la expresión modulada de uno o más genes relacionados con Wnt, usando una matriz de genes o proteínas u otro método de detección tal como se describe en el presente documento. Los resultados del análisis revelarán si el tratamiento o régimen es eficaz para retrasar el envejecimiento cardíaco en el individuo.

En un aspecto, la invención proporciona un método para explorar un agente o régimen con respecto a la capacidad de retrasar el envejecimiento cardíaco. Este método comprende las etapas de: (a) determinar un primer perfil de expresión génica midiendo productos de transcripción o de traducción de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en tejido cardíaco de un sujeto de edad avanzada en ausencia del agente o régimen; (b) determinar un segundo perfil de expresión génica midiendo productos de transcripción o de traducción de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en tejido cardíaco de un sujeto de edad avanzada en presencia del agente o régimen; y (c) comparar el primer perfil de expresión génica con el segundo perfil de expresión génica, en el que un cambio en el segundo perfil de expresión génica indica que es probable que el agente o régimen sea útil para retrasar el envejecimiento cardíaco cuando se administra a un individuo.

Métodos de este tipo pueden comprender, además, comparar al menos el segundo perfil de expresión génica con un perfil de expresión génica de referencia obtenido midiendo productos de transcripción o de traducción de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en tejido cardíaco de un sujeto joven o en tejido cardíaco de un sujeto de edad avanzada en presencia de una sustancia o régimen de referencia que se sabe que retrasa el envejecimiento cardíaco cuando se administra a un individuo. Dichos regímenes o sustancias incluyen, por ejemplo, restricción calórica (RC) o ingestión de resveratrol.

Similar a los métodos previos, la comparación entre el perfil de expresión génica de ensayo y el perfil de referencia es relativamente contemporánea, es decir, células o tejido cardíaco de sujetos viejos y jóvenes se ensayan unos al lado de otros. Como alternativa, sin embargo, la referencia usada para comparación puede basarse en datos obtenidos previamente usando el método. En esta realización, las sondas son expuestas a una muestra para formar complejos de hibridación o de unión que se detectan y se comparan con los de un estándar, que pueden comprender información recopilada previamente que se correlaciona con los niveles de expresión génica de Wnt con una edad biológica conocida de las células o tejido cardíaco, o se somete a un régimen o tratamiento de referencia que tiene un efecto conocido sobre el envejecimiento cardíaco, según lo medido mediante expresión de genes relacionados con Wnt (por ejemplo, RC o ingestión de resveratrol).

En ciertas realizaciones, los genes relacionados con Wnt son Dlg1, Magi3, Akt1, Dab2, Rac1, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1, Senp2, Smad3, Mark2, Ccnd1 o Pias4. Otras realizaciones utilizan Dlg1, Magi3, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1 o Senp2. Aún otras realizaciones utilizan Magi3, Ctnnb1 o Camk2d. En una realización específica, se mide la expresión de un gen que codifica beta-catenina, por ejemplo, Ctnnb1.

En una realización, el método se realiza en una población de células cultivadas. Una construcción de ácido nucleico que comprende un gen relacionado con Wnt de acuerdo con la invención se introduce en células huéspedes cultivados. Las células huésped pueden ser líneas celulares de mamífero, preferentemente de origen o linaje cardíaco, o líneas progenitoras que se sabe que se diferencian en células cardíacas, tal como sería conocido en la técnica. Las secuencias codificantes de los genes están enlazadas de forma operativa a elementos de expresión reguladores apropiados adecuados para la célula huésped particular a utilizar. Las construcciones de ácido nucleico pueden introducirse en las células huésped de acuerdo con cualquier medio aceptable en la técnica, incluyendo aunque sin limitarse a, transfección, transformación, precipitación con fosfato cálcico, electroporación y lipofección.

Dichas técnicas se conocen bien y son rutinarias en la técnica.

Pueden llevarse a cabo ensayos de expresión génica usando una construcción génica que comprende el promotor de un gen relacionado con el envejecimiento seleccionado, enlazado de forma operativa a un gen informador. La construcción informadora puede introducirse en una célula cultivada adecuada, incluyendo, sin limitación, las líneas celulares huésped estándar descritas anteriormente, o células recién aisladas de un sujeto, tales como células adiposas o musculares. El ensayo se realiza monitorizando la expresión del gen informador en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo.

En otra realización, el método se realiza en animales. Normalmente, un compuesto de ensayo o régimen de ensayo (alimentario, de ejercicio y similares) se administra a un sujeto y el perfil de expresión génica en un tejido cardíaco seleccionado del sujeto se analiza para determinar el efecto del compuesto de ensayo sobre la transcripción o la traducción de los genes o productos génicos relacionados con Wnt. La expresión génica puede analizarse *in situ* o *ex vivo* para determinar el efecto del compuesto de ensayo. Se desvela que un compuesto o régimen de ensayo se administra a un sujeto y la actividad de una proteína expresada a partir de un gen se analiza *in situ* o *ex vivo* de acuerdo con cualquier medio adecuado en la técnica para determinar el efecto del compuesto de ensayo sobre la actividad de las proteínas de interés. Además, donde un compuesto de ensayo se administra a un sujeto, los efectos

fisiológicos, sistémicos y físicos del compuesto, así como la toxicidad potencial del compuesto también pueden evaluarse.

Las sustancias de ensayo pueden ser cualquier sustancia o combinación de sustancias que puedan tener un efecto sobre el envejecimiento cardíaco según lo determinado por un cambio, o inversión de un cambio asociado a la edad, en la expresión de genes relacionados con Wnt tal como se ha enumerado anteriormente. Sustancias de ensayo adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a, aminoácidos; proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, polinucleótidos, moléculas pequeñas, macromoléculas, vitaminas, minerales, azúcares simples; azúcares complejos; polisacáridos; carbohidratos; triglicéridos de cadena media (MCT); triacilglicéridos (TAG); ácidos grasos n-3 (omega-3), incluyendo DHA, EPA, ALA; ácidos grasos n-6 (omega-6) incluyendo LA, ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA) y ARA; SA, ácido linoleico conjugado (CLA); fuentes de colina tales como lecitina; vitaminas solubles en grasa incluyendo la vitamina A y precursores de la misma tales como carotenoides (por ejemplo,  $\beta$ -caroteno), fuentes de vitamina D tales como vitamina D2 (ergocalciferol) y vitamina D3 (colecalfiferol), fuentes de vitamina E tales como tocoferoles (por ejemplo,  $\alpha$ -tocoferol) y tocotrienoles, así como derivados de vitamina E tales como Trolox, y fuentes de la vitamina K tales como vitamina K1 (filoquinona) y vitamina K2 (menadiona); vitaminas solubles en agua incluyendo vitaminas B como riboflavina, niacina (incluyendo nicotinamida y ácido nicotínico), piridoxina, ácido pantoténico, ácido fólico, biotina y cobalamina, y vitamina C (ácido ascórbico); antioxidantes, incluyendo algunas de las vitaminas mencionadas anteriormente, especialmente las vitaminas E y C; también bioflavonoides, tales como apigenina, catequina, flavonona, genisteína, naringenina, quercetina y teaflavina; quinonas tales como ubiquinona; carotenoides como licopeno y licoxantina; y ácido  $\alpha$ -lipoico; L-carnitina; D-limoneno; glucosamina; S-adenosilmetionina; quitosana; alginato; calcio; ácido hialurónico; magnesio; ácido monooleilfosfatídico; óxido nítrico (por ejemplo, como nitroglicerina); S-carbamilcisteína (un análogo de aminoácido); butirato de sodio; salicilato de sodio; espermidina; esfingosina; y glucosa. Se desvela que sustancias de ensayo son nutrientes que pueden añadirse a alimentos o consumirse como un suplemento.

Se desvela una sustancia o régimen identificado mediante el método mencionado anteriormente como probable que retrase el envejecimiento cardíaco cuando se administra a un individuo. Debido a la manera en la que se identifican, dichas sustancias aumentarán la señalización de Wnt en el corazón, o aumentarán la expresión o actividad de uno o más genes o productos génicos implicados en la señalización de Wnt en el corazón, o invertirán al menos parcialmente la disminución asociada a la edad en la expresión de genes relacionados con Wnt o la actividad de productos génicos en el corazón.

Se desvela un kit para medir la edad biológica de células o tejido cardíaco. El kit comprende, en recipientes independientes en un envase único, o en recipientes independientes en un envase virtual: (1) reactivos adecuados para medir la expresión de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en las células o tejido cardíaco, y (2) instrucciones para cómo usar las mediciones de expresión de los genes relacionados con la señalización de Wnt en las células o tejido cardíaco para determinar la edad biológica de las células o tejido cardíaco. Se desvela que el kit comprende reactivos adecuados para medir dos o más genes relacionados con Wnt.

Se desvela que los genes relacionados con Wnt son Dlg1, Magi3, Akt1, Dab2, Rac1, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1, Senp2, Smad3, Mark2, Ccnd1 o Pias4. Se desvela utilizar Dlg1, Magi3, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1 o Senp2. Se desvela utilizar Magi3, Ctnnb1 o Camk2d. Se desvela que se mide la expresión de un gen que codifica beta-catenina, por ejemplo, Ctnnb1. Se desvela que se mide la cantidad o la actividad de beta-catenina en una muestra.

Se desvela que los al menos algunos de los reactivos son sondas que comprenden: (a) polinucleótidos que hibridan específicamente con o amplifican productos de transcripción de expresión génica, o fragmentos de los mismos; o (b) agentes de unión a polipéptidos que se unen específicamente a productos de traducción de expresión génica, o fragmentos de los mismos. Se desvela que los agentes de unión a polipéptidos son anticuerpos, que pueden ser anticuerpos policlonales y/o monoclonales. Se desvela que las sondas se unen a un sustrato, y pueden organizarse sobre el sustrato en una matriz.

El kit puede comprender, además, una referencia para correlacionar el nivel de expresión de los genes con el envejecimiento cardíaco. Dicha referencia puede comprender una o más de (1) células o tejidos cardíacos de una o más edades biológicas conocidas, o (2) información que comunica el nivel de expresión esperado para cada gen en células o tejidos cardíacos de una o más edades biológicas conocidas. El kit también puede comprender una sustancia de referencia, tal como resveratrol, cuya ingestión ha sido demostrada por los inventores que invierte el efecto del envejecimiento cardíaco sobre la expresión génica de Wnt.

En cualquiera de los tipos de kits mencionados anteriormente, cuando el kit comprende un envase virtual, el kit está limitado a instrucciones en un entorno virtual en combinación con uno o más componentes físicos del kit. Se desvela que el kit contiene sondas y/u otros componentes físicos y las instrucciones para usar las sondas y otros componentes están disponibles a través de internet. El kit puede contener artículos adicionales tales como un dispositivo para mezclar muestras, sondas y reactivos y dispositivos para usar el kit, por ejemplo, tubos de ensayo o utensilios de mezcla.

Se desvela un envase que comprende reactivos adecuados para medir la expresión génica de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en células o tejido cardíaco; comprendiendo además el envase una etiqueta fijada al envase, conteniendo la etiqueta una palabra o palabras, foto, diseño, acrónimo, eslogan, frase, u otro dispositivo, o combinación de los mismos que indica que el contenido del envase contiene reactivos para determinar la edad biológica de células o tejido cardíaco.

Se desvela un sistema informático que comprende una base de datos que contiene información que identifica niveles de expresión de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en células o tejido cardíacos, que están reducidos en corazones de animales de edad avanzada en comparación con jóvenes, y una interfaz del usuario que permite a un usuario acceder o manipular la información en la base de datos. La base de datos puede contener información que identifique el nivel de expresión de uno o más genes implicados en la señalización de Wnt, tales como Dlg1, Magi3, Akt1, Dab2, Rac1, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1, Senp2, Smad3, Mark2, Ccnd1 o Pias4, y una interfaz del usuario para interactuar con la base de datos, particularmente para introducir, manipular, y revisar la información para diferentes animales o categorías de animales. Se desvela que la base de datos contiene, además, información que identifica el nivel de actividad de uno o más polipéptidos codificados por genes relacionados con Wnt. Se desvela que la base de datos comprende, además, información de secuencia para uno o más de genes relacionados con Wnt y sus proteínas codificadas, preferentemente de diversas especies. Se desvela que la base de datos contiene información adicional relativa a la descripción de los genes en una o más especies animales. El sistema informático es cualquier dispositivo electrónico capaz de contener y manipular los datos e interactuar con un usuario, por ejemplo, un ordenador típico o un instrumento analítico diseñado para facilitar el uso de la invención y la emisión de los resultados relacionados con el estado de un animal.

Se desvela un medio para comunicar información sobre, o instrucciones para el uso de uno o más de, (1) genes relacionados con la señalización de Wnt en células o tejidos cardíacos, que se reducen en corazones de animales de edad avanzada en comparación con jóvenes, (2) retrasar el envejecimiento cardíaco en un individuo aumentando la señalización de Wnt y/o aumentando la cantidad o la actividad de beta-catenina en el corazón del individuo, (3) retrasar el envejecimiento cardíaco en un individuo administrando un agente o un régimen que aumenta la señalización de Wnt, y/o aumenta la cantidad o la actividad de beta-catenina en el corazón del individuo, (4) explorar compuestos o regímenes de ensayo con respecto a su capacidad para retrasar el envejecimiento cardíaco modulando la expresión de genes relacionados con la señalización de Wnt en el corazón, (5) determinar la edad biológica de células y tejido cardíaco midiendo la expresión de genes relacionados con la señalización de Wnt en las células y tejidos cardíacos, y (6) kits y reactivos para medir la expresión diferencial de genes relacionados con la señalización de Wnt en células o tejidos cardíacos de animales de edad avanzada en comparación con jóvenes; en los que el medio comprende uno o más de un documento físico o electrónico, medios de almacenamiento digitales, medios de almacenamiento ópticos, presentación de audio, representación audiovisual, o representación visual que contiene la información o instrucciones.

El medio puede seleccionarse entre diversos medios conocidos en la técnica, o cualquier combinación de dichos medios, incluyendo aunque sin limitarse a: un sitio web visualizado, un quiosco de representación visual, un folleto, una etiqueta de producto, un prospecto, un anuncio, un impreso, un anuncio público, una cinta de audio, un vídeo, un DVD, un CD-ROM, un chip legible por ordenador, una tarjeta legible por ordenador, un disco legible por ordenador, un dispositivo USB, un dispositivo FireWire, y/o una memoria de ordenador.

Se desvelan métodos para retrasar el envejecimiento cardíaco en un individuo, que se centran en aumentar la señalización de Wnt en el corazón del individuo. Los individuos pueden ser animales de cualquier especie o clase que son de edad avanzada, o susceptibles a o que padecen una enfermedad o afección que causa envejecimiento cardíaco, incluyendo animales de cualquier edad, especie, estado de salud, y similares. Preferentemente, los animales son seres humanos o animales de compañía, tales como perros o gatos. Se desvela que los animales son animales de edad avanzada susceptibles a o que padecen envejecimiento de diversas células y tejidos del corazón.

Se desvela que los animales son animales susceptibles a o que padecen una enfermedad o afección que somete a estrés o envejece el corazón, o una enfermedad o afección del corazón que está asociada con individuos más viejos y que causa efectos perjudiciales en otras partes del cuerpo. En cualquier caso, la aplicación de los métodos de la invención para retrasar el envejecimiento cardíaco tendría un efecto beneficioso sobre el corazón del individuo y, de este modo, sobre todo el individuo. Dichas afecciones o enfermedades incluyen, aunque sin limitarse a: cáncer, SIDA, cardiopatía congestiva, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia renal, quemaduras graves, ataque cardíaco (isquemia), arteriopatía coronaria, aterosclerosis, cirugía, por ejemplo, angioplastia o bypass cardíaco, cardiopatía valvular, cardiomiopatía hipertrófica y similares. Un individuo puede considerarse "susceptible" al envejecimiento cardíaco o al desarrollo de enfermedades o afecciones asociadas con el envejecimiento cardíaco si el individuo muestra uno o más factores de riesgo de cardiopatía, angiopatía, y similares. Dichos factores de riesgo son conocidos por el experto en la materia, e incluyen, aunque sin limitarse a: sobrepeso, inactividad física, tensión arterial alta, colesterol y/o triglicéridos altos, angina de pecho, diabetes, tabaquismo, herencia, pertenencia al sexo masculino, estrés e ingestión excesiva de alcohol.

Un método típico para retrasar el envejecimiento cardíaco en un individuo comprende las etapas de: (a) identificar un individuo en el que se desea retrasar el envejecimiento cardíaco; y (b) modular la expresión de al menos un gen que

afecta a la señalización de Wnt en el corazón del individuo, en el que la modulación da como resultado un aumento de la señalización de Wnt en el corazón, retrasando de este modo el envejecimiento cardiaco en el individuo. Se desvela que los genes relacionados con Wnt son Dlg1, Magi3, Akt1, Dab2, Rac1, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1, Senp2, Smad3, Mark2, Ccnd1 o Pias4. Se desvela la modulación de Dlg1, Magi3, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1 o Senp2. Se desvela utilizar Magi3, Ctnnb1 o Camk2d. Se desvela que la expresión de un gen que codifica beta-catenina, por ejemplo, Ctnnb1, es modulada. Se desvela que se modula la cantidad o la actividad de beta-catenina en un individuo.

Se desvela que la modulación comprende aumentar la expresión de los uno o más genes. Se desvela que la señalización de Wnt aumentada está asociada con un aumento de la cantidad o la actividad de beta-catenina en el corazón del individuo.

Se desvela administrar al individuo una cantidad eficaz de uno o más agentes, o someter al individuo a uno o más regímenes que aumentan la señalización de Wnt en el corazón, o que invierte al menos parcialmente reducciones asociadas a la edad en la señalización de Wnt en el corazón, retrasando de este modo el envejecimiento cardiaco en el individuo. El agente puede actuar imitando la actividad de beta-catenina en el corazón del individuo.

Se desvela que pueden utilizarse regímenes que incluyen RC o ingestión de resveratrol para retrasar el envejecimiento cardiaco aumentando la señalización de Wnt en el corazón del individuo o invirtiendo al menos parcialmente la reducción asociada a la edad en la señalización de Wnt en el corazón. Dichos regímenes pueden combinarse con otros regímenes o agentes, tales como los identificados mediante los métodos descritos en el presente documento.

Se desvela administrar por vía oral a un individuo, de forma regular, preferentemente de forma regular prolongada, una sustancia que aumenta la señalización de Wnt en el corazón, retrasando de este modo el envejecimiento cardiaco. Normalmente la sustancia es administrada regularmente durante al menos dos semanas, más preferentemente durante al menos cuatro semanas o más tiempo. La administración de la sustancia puede continuar indefinidamente, por ejemplo, durante uno, dos, tres, seis o nueve meses, o durante un año o más, o incluso durante la vida del individuo. La sustancia generalmente se administra al menos diariamente, pero el régimen de dosificación dependerá de la naturaleza y la potencia de la sustancia. Por consiguiente, la administración puede ser más frecuente, por ejemplo, dos o tres veces al día, o menos frecuente, por ejemplo, tres veces a la semana, dos veces a la semana, semanalmente, dos veces al mes o mensualmente.

Se desvela que la administración oral regular prolongada de la sustancia causa un cambio en la expresión, o una inversión de un cambio asociado a la edad en la expresión, de uno o más de Dlg1, Magi3, Akt1, Dab2, Rac1, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1, Senp2, Smad3, Mark2, Ccnd1 o Pias4. Se desvela centrarse en la modulación de Dlg1, Magi3, Ctnnb1, Camk2d, Mapk1 o Senp2. Se desvela utilizar Magi3, Ctnnb1 o Camk2d. Se desvela que la expresión de un gen que codifica beta-catenina, por ejemplo, Ctnnb1, está modulada por la administración oral regular prolongada de la sustancia. Se desvela que la cantidad o la actividad de beta-catenina en un individuo está modulada. El resveratrol es un ejemplo de una sustancia que, cuando se administra por vía oral a un sujeto de forma regular prolongada, invierte cambios asociados a la edad en la expresión de genes relacionados con Wnt en el corazón.

Se desvela que la modulación comprende aumentar la expresión de los uno o más genes. Se desvela que la señalización de Wnt aumentada está asociada con un aumento de la cantidad o actividad de beta-catenina en el corazón del individuo.

Cuando se utiliza como un suplemento para requisitos dietéticos ordinarios, la sustancia puede administrarse directamente al animal. La sustancia puede, como alternativa, ponerse en contacto con, o mezclarse con, pienso o alimento diario, incluyendo un fluido, tal como agua potable, o suministrarse como un suplemento dietético. Cuando se utiliza junto con o incorporado en un pienso o alimento diario, la administración será bien conocida por los expertos en la materia. La administración puede llevarse a cabo como parte de un régimen alimentario para el animal. Por ejemplo, un régimen alimentario puede comprender causar la ingestión regular por el animal de la sustancia, en una cantidad eficaz para retrasar el envejecimiento cardiaco. Se desvela que la sustancia se administra al animal junto con uno o más fármacos, nutracéuticos, o agentes nutricionales para retrasar el envejecimiento cardiaco o para incrementar la longevidad en general.

Se desvela que dosis diarias o periódicas para la sustancia administrada de acuerdo con este método varían entre aproximadamente 0,001 g/kg de peso corporal y 10 g/kg de peso corporal. Más particularmente, la dosis supera 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 o 0,1 g/kg de peso corporal. Se desvela que la dosificación puede ser de 0,2, 0,5, 1, 3, 5, 7 o 10 g/kg de peso corporal o más, dependiendo de la sustancia y la frecuencia de dosificación. El experto en la materia está familiarizado con el desarrollo de dosificaciones y regímenes de dosificación para sujetos.

**EJEMPLOS**

La invención puede ilustrarse adicionalmente mediante el siguiente ejemplo, aunque se entenderá que este ejemplo está incluido simplemente para fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención a menos que se indique específicamente otra cosa.

## Ejemplo 1

## Materiales y métodos

Se seleccionaron dos conjuntos de datos públicos de expresión génica de envejecimiento cardiaco en roedores del Gene Expression Omnibus (GEO) del NCBI: (1) El estudio en ratas de la universidad de Washington (UW) (Linford JL y col. (2007) Transcriptional Response to Aging and Calorie Restriction in Heart and Adipose Tissue. *Aging Cell* 6: 673-688) (estudio 1); y (2) el estudio en ratón de LifeGen (Barger JL y col. (2008) A Low Dose of Dietary) (estudio 2). Los materiales y métodos para los dos estudios se muestran en las referencias. Un tercer conjunto de datos provino de un estudio de envejecimiento cardiaco en ratón no publicado. En ese estudio, los ratones se dividieron en dos grupos (n=7) y se alimentaron con dieta de control de acuerdo con los procedimientos en el estudio de Barger. Los ratones fueron sacrificados a las edades de 5 meses (grupo joven) y 25 meses (grupo viejo). Se recogieron tejidos cardiacos y se sometieron a ensayos de expresión génica en micromatriz (estudio 3). En el estudio 2 y el estudio 3, se usaron chips génicos del genoma de ratón 430 2.0 de Affymetrix. En el estudio 1, se usaron chips génicos del genoma de ratón 230 2.0 de Affymetrix. Una descripción de los tres estudios se perfila en la tabla 1.

Tabla 1

Nombre	Fuente	Especie	Diseño				N.º de muestra
			Joven	Viejo	RC	Resveratrol	
Estudio 2	NCBI	Ratón	5	30	30+RC	30+Resveratrol	5
Estudio 1	NCBI	Rata	4	28	28+RC	/	6
Estudio 3	Interna	Ratón	5	25	/	/	7

Los datos se inspeccionaron por primera vez para calidad y se examinaron para posibles valores atípicos. Tres muestras, una de cada estudio, se identificaron como valores atípicos y se eliminaron del análisis adicional. Genes diferenciales fueron identificados entre los grupos joven y viejo en cada estudio usando algoritmo de análisis de significación de micromatrices (SAM) (Tusher, Tibshirani y Chu (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *PNAS* 2001 98: 5116-5121). Los criterios de selección incluyen magnitud del cambio de expresión (veces $\geq$ 1,2) y la tasa de falsos descubrimientos (FDR $<$ 0,5 %).

Para determinar el impacto de los cambios de la expresión génica en el nivel del sistema, se realizó análisis de la ruta en los conjuntos de datos del estudio 2 y el estudio 3 usando el software GenMAPP y MAPPFinder (Salomonis, K Hanspers, AC Zambon, K Vranizan, SC Lawlor, KD Dahlquist, SW Doniger, J Stuart, BR Conklin, y AR Pico. GenMAPP 2: new features and resources for pathway analysis. *BMC Bioinformatics*, junio de 2007; 8: 217). Se usaron sondas de todo el chip con los mismos criterios de selección, veces $>$ 1,2 y FDR $<$ 0,5 %. Se seleccionaron las rutas con las asociaciones más significativas dentro de los datos. Los inventores determinaron que la ruta de señalización de Wnt estaba entre aquellas con asociaciones más significativas (valor p ajustado de 0,011 en los conjuntos de datos tanto del estudio 2 como del estudio 3).

Los genes en la ruta de Wnt se examinaron adicionalmente para sus cambios de expresión. Aproximadamente una docena de genes mostraron expresiones reducidas en corazón envejecido en comparación con corazón joven en el estudio 2. Esos genes/proteínas se enumeran en la tabla 2, junto con respectivos números de acceso al GenBank representativos, y los resultados del estudio 2 se muestran en la tabla 3. La expresión de estos genes también se examinó en el grupo con restricción de calorías (RC) y el grupo de resveratrol ("Resv"). Tal como se muestra en la tabla 3, la expresión de todos estos genes excepto tres se elevó a sus niveles jóvenes con tratamiento con RC o Resv. La mayoría de los genes regulados negativamente en corazón envejecido fueron determinantes positivos de la ruta de Wnt, lo que indica que la ruta de Wnt está regulada negativamente en corazones viejos frente a jóvenes en ratones.



Tabla 2

Genes regulados de forma diferencial en tejido cardiaco viejo frente a joven (estudio 2)					
ID de la sonda	Símbolo	N.º de acceso al GenBank		N.º de acceso de proteína	
		Ratón	Rata	Ratón	Rata
1450768_at	Dlgh1	NM_007862	NM_012788	NP_031888	NP_036920
1421035_a_at	Magi3	NM_001159354	NM_139084	NP_001152826	NP_620784
1425711_a_at	Akt1	NM_009652	NM_033230	NP_033782	NP_150233
1430604_a_at	Dab2	NM_023118	NM_024159	NP_075607	NP_077073
1423734_at	Rac1	NM_009007	NM_134366	NP_033033	NP_599193
1430533_a_at	Ctnnb 1	NM_001165902	NM_053357	NP_001159374	NP_445809
1450008_a_at	Ctnnb1	NM_001165902	NM_053357	NP_001159374	NP_445809
1427763_a_at	Camk2d	NM_001025438	NM_012519	NP_001020609	NP_036651
1426585_s_at	Mapk1	NM_001038663	NM_053842	NP_001033752	NP_446294
1425465_a_at	Senp2	NM_029457	NM_023989	NP_083733	NP_076479
1450471_at	Smad3	NM_016769	NM_013095	NP_058049	NP_037227
1435889_at	Mark2	NM_001080388	NM_021699	NP_001073857	NP_067731
1448698_at	Ccnd1	NM_007631	NM_171992	NP_031657	NP_741989
1455394_at	Pias4	NM_021501	NM_001100757	NP_067476	NP_001094227

5

Tabla 3

Cambio en la expresión génica de la ruta de Wnt en tejido cardiaco viejo frente a joven, y según es afectado por RC o resveratrol (estudio 2)						
Símbolo	(A) Cambio en veces*			(B) FDR		
	Viejo frente a joven	RC frente a viejo	Resv frente a viejo	Viejo frente a joven	RC frente a viejo	Resv frente a viejo
Dlgh1	-1,528	1,154	1,150	0,010	NS**	NS
Magi3	-1,366	1,195	1,244	0,010	0,010	0,050
Akt1	-1,814	-1,119	-1,315	0,010	NS	NS
Dab2	-1,296	1,201	1,227	0,010	0,010	0,010
Rac1	-2,004	1,712	1,509	0,010	0,010	0,010
Ctnnb1(1)	-3,038	3,177	2,787	0,010	0,010	0,010
Ctnnb1(2)	-1,904	2,143	2,017	0,010	0,010	0,010
Camk2d	-1,933	1,541	1,235	0,010	0,010	0,050
Mapk1	-1,290	-1,035	-1,020	0,010	NS	NS
Senp2	-1,538	1,071	1,261	0,010	NS	0,050
Smad3	-1,371	1,412	1,285	0,010	0,010	0,050
Mark2	1,531	-2,069	-2,113	0,010	0,010	0,010
Ccnd1	1,395	-1,651	-1,158	0,010	0,010	NS
Pias4	1,306	-1,514	-1,495	0,010	0,010	0,010

\* Los números indican cambios de expresión en veces (A) y la tasa de falsos descubrimientos (B)  
 \*\* NS = no significativo

Se llevó a cabo un estudio de integración para identificar genes con cambios similares del perfil de expresión en los tres estudios y para identificar potenciales biomarcadores. Los resultados se muestran en la tabla 4. Tres genes, Magi3, Ctnnb1 y Camk2d, estaban regulados negativamente en corazón viejo frente a corazón joven en los tres estudios. Un cuarto gen, Senp2, estaba regulado negativamente en dos estudios (estudio 1 y estudio 2). Se prestó especial atención a la beta-catenina (ctnnb1), un componente clave en la ruta de señalización de Wnt. La beta-catenina desempeña un papel importante en la ruta de transducción de señales de Wnt, dado que media la señal de Wnt en el núcleo para asociación con diferentes factores de transcripción para activar una matriz de genes cadena abajo. Tal como se muestra en la tabla 4, la beta-catenina está regulada negativamente hasta tres veces (-3,04) en corazón viejo en el estudio 2 y su expresión vuelve a su nivel joven con RC (3,18) o dieta suplementada con resveratrol (2,79). Una segunda sonda de beta-catenina también mostraba un cambio similar con ligeramente menos magnitud. El cambio de veces de expresión para beta-catenina fue -1,3 y -1,5 en corazones viejos frente a jóvenes

en el estudio 3 y el estudio 1, respectivamente. Un cambio similar del perfil de expresión era evidente para Magi3 y Camk2d. Además, dos genes, Dlgh1 y Mapk1, estaban regulados negativamente tanto en el estudio 1 como en el estudio 2. Estos resultados muestran que la beta-catenina es un biomarcador para el envejecimiento cardiaco.

5

Tabla 4

Expresión diferencial de genes de la ruta de Wnt en tres perfiles de expresión génica de tejido cardiaco viejo frente a joven, y tratamiento con RC o resveratrol					
	Estudio 3	Estudio 1	Estudio 2		
Símbolo	Viejo frente a joven	Viejo frente a joven	Viejo frente a joven	RC frente a viejo	Resv frente a viejo
Dlgh1		-1,3	-1,528		
Magi3	-1,6	-1,4	-1,366	1,195	1,244
Ctnnb1 sonda 1	-1,3	-1,5	-3,038	3,177	2,787
Ctnnb1 sonda 2			-1,904	2,143	2,017
Camk2d	-2,1	-1,2	-1,933	1,541	1,235
Mapk1		-1,2	-1,290		
Senp2	1,5	-1,3	-1,538	1,071	1,261
Los números indican cambios de expresión en veces					

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de exploración de un agente o régimen con respecto a la capacidad de retrasar el envejecimiento cardiaco que comprende las etapas de:
- 10 a) determinar un primer perfil de expresión génica midiendo productos de transcripción o de traducción de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en tejido cardiaco de un sujeto de edad avanzada en ausencia del agente o régimen;
  - 15 b) determinar un segundo perfil de expresión génica midiendo productos de transcripción o de traducción de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en tejido cardiaco de un sujeto de edad avanzada en presencia del agente o régimen; y
  - 20 c) comparar el primer perfil de expresión génica con el segundo perfil de expresión génica, en el que un cambio en el segundo perfil de expresión génica indica que es probable que el material o régimen sea útil para retrasar el envejecimiento cardiaco cuando se administra a un individuo.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además comparar al menos el segundo perfil de expresión génica con un perfil de expresión génica de referencia obtenido midiendo productos de transcripción o de traducción de uno o más genes relacionados con la señalización de Wnt en tejido cardiaco de un sujeto joven o en tejido cardiaco de un sujeto de edad avanzada en presencia de una sustancia o régimen de referencia que se sabe que retrasa el envejecimiento cardiaco cuando se administra a un individuo; opcionalmente en el que la sustancia o régimen de referencia comprende restricción calórica o ingestión de resveratrol.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, en el que los genes son *Dlgh1*, *Magi3*, *Akt1*, *Dab2*, *Rac1*, *Ctnnb1*, *Camk2d*, *Mapk1*, *Senp2*, *Smad3*, *Mark2*, *Ccnd1* o *Pias4*.
4. El método de la reivindicación 3, en el que los genes son *Dlgh1*, *Magi3*, *Ctnnb1*, *Camk2d*, *Mapk1* o *Senp2*.
5. El método de la reivindicación 4, en el que los genes son *Magi3*, *Ctnnb1* o *Camk2d*.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el gen es *Ctnnb1*.