

VNIVERSITAT Æ VALÈNCIA

FACULTAD DE FISIOTERAPIA

Programa de Doctorado:

Los procesos de envejecimiento: estrategias sociosanitarias



**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE
FRAGILIDAD EN EL ESTUDIO DE TOLEDO DE
ENVEJECIMIENTO SALUDABLE**

TESIS DOCTORAL presentada por

MARTA INGLÉS DE LA TORRE

Dirigida por:

Dra. Celedonia Igual Camacho

Dra. Consuelo Borrás Blasco

Dr. Juan Gambini Buchón

Valencia, 2014

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

FACULTY OF PHYSIOTHERAPY

Doctorate Program:

The aging processes: health and social strategies



**IDENTIFICATION OF FRAILTY BIOMARKERS IN
THE TOLEDO STUDY OF HEALTHY AGING**

DOCTORAL THESIS presented by

MARTA INGLÉS DE LA TORRE

Supervised by:

Dra. Celedonia Igual Camacho

Dra. Consuelo Borrás Blasco

Dr. Juan Gambini Buchón

Valencia, 2014



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE FISIOTERAPIA

Prof. Dña. Celedonia Igual Camacho, Profesora Titular del Departamento de Fisioterapia de la Facultad Fisioterapia de la Universidad de Valencia.

Prof. Dña. Consuelo Borrás Blasco, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof. Don Juan Gambini Buchón, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Dña. **Marta Inglés de la Torre**, Graduada en Fisioterapia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección la presente Tesis Doctoral, titulada:

“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE FRAGILIDAD EN EL ESTUDIO DE TOLEDO DE ENVEJECIMIENTO SALUDABLE”

para la obtención del título de Doctora.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, 2014

Fdo. Dña. Celedonia Igual
Camacho

Fdo. Dña. Consuelo Borrás
Blasco

Fdo. Don Juan Gambini
Buchón

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido llevada a cabo gracias a la financiación obtenida de los proyectos: ISCIII2006-RED13-027 y ISCIII2012-RED-43-029 de la Red Temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad” (RETICEF).

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Parece mentira que la parte más difícil de una tesis sea, precisamente, aquella en la que no tienes que demostrar tus conocimientos, sino tu gratitud a las personas que te han acompañado a lo largo del camino. Es difícil encontrar las palabras para expresar mi agradecimiento a tanta gente que ha hecho posible esta, para mí, gran hazaña. Ahí va un intento:

A mis directores, Celedonia Igual, Consuelo Borrás y Juan Gambini.

Celedonia, gracias por brindarme siempre tu apoyo y tu cariño y por guiar mis pasos desde mis comienzos como profesora de la facultad de fisioterapia, así como todo el proceso de realización de esta tesis. Chelo, ya sabes que eres todo un ejemplo para mí, tanto en lo personal como en lo profesional, gracias por enseñarme a preguntarme el por qué de las cosas, por hacer que todo parezca fácil, por haber confiado en mí siempre y por demostrarme día a día que puedo contar contigo, como jefa y como amiga. A Juanito, no tengo palabras para darte las gracias... tú sabes que yo hoy no estaría escribiendo esto si no fuera por ti. Gracias por enseñarme a disfrutar tanto con el trabajo en el laboratorio, por enseñarme a aprender más de los errores que de los aciertos, por tus palabras de ánimo cuando he querido tirar la toalla pero, sobre todo, por estar siempre ahí. Como te digo una cosa te digo la otra...

A José Viña, gracias por darme la oportunidad de formar parte de un gran grupo de investigación, por implicarte en mi trabajo demostrando siempre un gran interés y cariño, por los consejos, tanto en lo profesional como en lo personal y por contagiarnos a todos día a día la pasión por la ciencia.

A Luis Villaplana. Todavía recuerdo cuando entré en el departamento de fisioterapia hace ya 8 años, llena de inseguridades, siempre supiste orientarme y darme los mejores consejos. Has pasado de ser un director a un amigo con todas las letras.

A Laura López, todo un ejemplo para mí, fuiste tú la que me hablaste un día de la posibilidad de hacer la tesis, me diste ánimo y creíste que yo era capaz de cumplir este sueño. Nunca olvidaré tus valiosos consejos, como compañera, pero sobretodo, como amiga.

A Antonio Alberola, gracias por abrirme las puertas al mundo de la investigación, por tus palabras constantes de ánimo y demostrarme siempre la gran persona que eres. Si yo hoy estoy investigando es gracias a ti, Antonio. Gracias también a Luis Such y Luis Such junior, que me han aconsejado siempre desde la experiencia y el cariño.

A todos y cada uno de mis compañeros del departamento de fisiología, especialmente a mi mini-grupo: Vicent y Mariya, mis compis de bancada y de risas, mis primeros profes y grandes amigos, espero que el destino os depare tantos éxitos profesionales como merecéis; Mar, la mami que más nos cuida y mima, ya sabes lo mucho que te aprecio; Lucía, tienes un corazón de oro, no tengo palabras para agradecerte tanto en tan poco tiempo, las risas, las sorpresitas diarias, los mensajes de ánimo, los debates de ciencia; Cris, tu dulzura, tu sonrisa y tus detallitos diarios conquistan a todos los que te rodeamos. Al grupo de ejercicio (Fabián, Vladimir, Helios, Thomas, Bea, Andrea y Helena) y al de Alzheimer (Esther, Tanja, Paloma), con los cuales he compartido momentos inolvidables a lo largo de este período. En especial a ti, Helios, por hacer que esta última etapa fuera más liviana en tu compañía y por aguantar y resolver todas mis dudas informáticas y burocráticas. A Javier, porque tu trabajo es clave en el

laboratorio. También a Gloria y M^a Carmen Gómez, por ser un apoyo importantísimo para mí, y a Ana Lloret, por estar siempre de una manera tan cercana.

A todos mis compañeros del departamento de fisioterapia, porque han sabido siempre apoyarme y comprenderme en todas mis decisiones, y con los cuales he compartido grandes momentos, especialmente a Anna Arnal, Clara Blasco y Pilar Serra, mis tres grandes amigas y apoyos, tanto dentro como fuera de las aulas. Y por supuesto gracias a Josep Benítez, José Casaña, Yasser, Manuel Zarzoso, Chema, Quique Sanchís, Quique Lluch, Mariluz, Marta Aguilar, Bea Gisbert, Bea Díaz, Sofía Pérez, Gema Espí, Lírios Dueñas y Marisa Basanta.

No puedo olvidarme de las secretarias de ambos departamentos: Yolanda, M^a José, Asun, Ana, de fisioterapia y Mary, Elena y Eva, de fisiología, gracias por vuestro constante apoyo. Inma, tú también, gracias por esas conversaciones de pasillo que tanto me animan. Y por supuesto gracias a Marilyn, por estar siempre dispuesta a resolver mis dudas con el inglés.

A Franjo y a Leo, y a todos los miembros de RETICEF, por permitirme formar parte de dicho grupo de investigación y proporcionarme siempre toda la ayuda necesaria para la realización de esta tesis.

Dr. Tilman Grüne, it was a pleasure for me to have the opportunity to work in your laboratory last summer. You and your group made me feel at home, and therefore I will always be very thankful to you all: Christiane, Dani, Anni, Toby, Kerstin, Jeannette, Sandra, Eva, Esther and Kerstin (the laboratory technicians), I miss you so much... I have beautiful memories and experiences of my stay in Jena: trips, parties at the river-side (surrounded by huge mosquitoes), BBQs (with the lovely sausages and burned marshmallows), meals at 11.30 a.m.

(unbelievable!), talks about science, our “keine panic”, crazy experiments with “gürke”... I wish you all the best and hope to see you soon, either in Germany or Spain... Vielen Dank an alle!

A Rebeca y Khirita, mis dos grandes pilares dentro y fuera del laboratorio, la amistad se define tal y como os habéis portado conmigo, sé que tengo en vosotras dos amigas para siempre y doy gracias por haberos conocido.

A mis amigas: Rocío, Luisa, Tere, Arancha, Patri y Carla, así como a mi prima Patri, gracias por estar en lo bueno y en lo malo, no sólo a lo largo de este período, sino también en todos los que hemos vivido juntas. Este año está cargado de momentos inolvidables para todas y quería que supierais que me siento orgullosa de que podamos compartirlos. No tengo muchas ocasiones como esta para deciros lo importante que sois para mí y cuánto os quiero... Santi, me has demostrado que la distancia no es impedimento cuando la amistad es verdadera, gracias por haber estado siempre ahí.

Me he dejado para el final a los verdaderos artífices de todo este trabajo: mi familia. Mamá, papá, Ele y Kike; por mucho que me esforzara, nunca conseguiría plasmar en unas líneas lo agradecida que os estoy, por acompañarme y guiar mis pasos no sólo a lo largo de esta aventura, sino durante toda mi vida. Me siento muy orgullosa de tener la familia que tengo, sois un ejemplo para mí y todo resulta más fácil a vuestro lado. Esta tesis os la dedico a vosotros, puesto que sin vuestro cariño y apoyo nada hubiera sido posible. Os quiero infinito. Por supuesto, gracias también al pequeño Fede, mis cuñados Luigi e Isa, mis tíos (sobre todo mi padrino Fernando y mi tía Nana, que tanto se han interesado por esta tesis), mis primos y Max, que aunque ya no está físicamente entre nosotros, siempre estará en mi corazón...

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT/ RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. ANTECEDENTES.....	15
1.1.1. ENVEJECIMIENTO.....	15
1.1.1.1. Concepto de envejecimiento.....	15
1.1.1.2. Tipos de envejecimiento.....	17
1.1.1.3. Teorías de envejecimiento.....	19
1.1.1.4. Valoración geriátrica integral.....	23
1.1.2. FRAGILIDAD.....	25
1.1.2.1. Concepto.....	25
1.1.2.2. Prevalencia.....	28
1.1.2.3. Comorbilidad, discapacidad y fragilidad.....	29
1.1.2.4. Bases fisiopatológicas de la fragilidad.....	31
1.1.2.5. Marcadores clínicos de fragilidad.....	33
1.1.2.6. Biomarcadores de fragilidad.....	36
1.1.2.6.1. Sistema neuroendocrino.....	38
1.1.2.6.2. Sistema inmune y cardiovascular.....	38
1.1.2.6.3. Sistema músculo-esquelético.....	39

1.1.2.6.4. Sistema metabólico.....	41
1.1.2.7. Estrategias de intervención	42
1.1.3. ESTRÉS OXIDATIVO.....	44
1.1.3.1. Radical libre.....	45
1.1.3.1.1. Concepto	45
1.1.3.1.2. Génesis de radicales libres	47
1.1.3.1.3. Mecanismos de protección frente a los radicales libres: antioxidantes fisiológicos	48
1.1.3.1.4. Papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento	49
1.1.3.2. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas.....	50
1.1.3.2.1. Daño oxidativo a lípidos	50
1.1.3.2.2. Daño oxidativo a proteínas	51
1.1.3.2.3. Daño oxidativo a glúcidos	53
1.1.3.2.4. Daño oxidativo al ADN	54
1.1.3.3. Marcadores de estrés oxidativo	55
1.1.3.4. Estrés oxidativo y fragilidad	56
1.1.4. FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF).....	59
1.1.4.1. Concepto.....	59
1.1.4.2. BDNF y estrés oxidativo	62
1.1.4.3. BDNF y fragilidad	63

1.1.5. VARIACIONES GÉNICAS: POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPs) Y VARIANTES RARAS	64
1.1.5.1. Marco teórico	64
1.1.5.2. Relevancia biológica.....	67
1.1.5.3. Estudios de asociación del genoma completo (GWAS)	68
1.1.5.4. Estudios GWAS sobre fragilidad	71
1.1.5.4.1. Variación génica y fragilidad	72
1.1.5.4.2. Variación génica y manifestaciones clínicas de la fragilidad.....	74
1.2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	75
1.3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	76
1.4. OBJETIVOS	77
1.4.1. Objetivo general.....	77
1.4.2. Objetivos específicos	77
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
2.1. MUESTRA.....	81
2.2. RECURSOS MATERIALES	81
2.2.1. RECURSOS MATERIALES CLÍNICOS.....	81
2.2.2. RECURSOS MATERIALES DE LABORATORIO	83
2.2.2.1. Aparatos.....	83
2.2.2.2. Reactivos.....	86

2.3. DISEÑO DEL ESTUDIO	86
2.4. DETALLE DE LAS FASES	89
2.4.1. PRIMERA FASE.....	90
2.4.2. SEGUNDA FASE	91
2.4.3. TERCERA FASE	92
2.4.3.1. Valoración clínica del deterioro cognitivo: MMSE.....	92
2.4.4. CUARTA FASE	93
2.4.4.1. Determinación de parámetros antropométricos para la determinación del índice de masa corporal: PESO Y TALLA	93
2.4.4.2. Valoración clínica de la fragilidad: CRITERIOS DE FRIED.....	94
2.4.4.3. Valoración clínica de la independencia para la realización de las actividades básicas de la vida diaria (ABVD): ÍNDICE DE KATZ	97
2.4.4.4. Valoración clínica de la independencia para la realización de las actividades instrumentales de la vida diaria (AIVD): ÍNDICE DE LAWTON Y BRODY.....	98
2.4.4.5. Extracción sanguínea	98
2.4.5. QUINTA FASE.....	100
2.4.6. SEXTA FASE.....	101
2.4.6.1. Determinación de niveles de MDA en plasma.....	101
2.4.7. SÉPTIMA FASE	105
2.4.7.1. Determinación de proteínas totales plasmáticas: MÉTODO DE LOWRY	105

2.4.7.2. Determinación de proteínas carboniladas en plasma: <i>WESTERN BLOTTING</i>	108
2.4.8. OCTAVA FASE	111
2.4.8.1. Determinación de los niveles de BDNF en plasma: ELISA.....	112
2.4.9. NOVENA FASE	115
2.4.9.1. Genotipado de las muestras	116
2.4.9.2. Algoritmo del genotipado y controles de calidad.....	118
2.4.10. DÉCIMA FASE	119
2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	119
2.5.1. ANÁLISIS DE VARIABLES CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS	119
2.5.2. ANÁLISIS DE VARIABLES GENÉTICAS	121
2.5.2.1. Control de calidad	121
2.5.2.2. Análisis de SNPs individuales	121
2.5.2.3. Análisis por gen	122
2.5.2.4. Análisis por vía de señalización.....	123
2.6. TRATAMIENTO BIBLIOGRÁFICO.....	124
3. RESULTADOS	125
3.1. PERFIL DE LA MUESTRA	127
3.1.1. Sexo	127
3.1.2. Edad	128

3.1.3. Índice de masa corporal (IMC).....	128
3.2. ESCALAS DE DEPENDENCIA FUNCIONAL EN NO FRÁGILES, PREFRÁGILES Y FRÁGILES	129
3.2.1. ÍNDICE DE KATZ.....	129
3.2.2. ÍNDICE DE LAWTON Y BRODY	134
3.3. ESCALA DE DETERIORO COGNITIVO EN NO FRÁGILES, PREFRÁGILES Y FRÁGILES.....	138
3.3.1. ESCALA MMSE.....	138
3.4. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS CON DETERIORO COGNITIVO EN PLASMA EN NO FRÁGILES, PREFRÁGILES Y FRÁGILES	143
3.4.1. NIVELES DE BDNF EN PLASMA	143
3.5. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA EN NO FRÁGILES, PREFRÁGILES Y FRÁGILES	147
3.5.1. NIVELES DE MDA EN PLASMA.....	147
3.5.2. NIVELES DE PROTEÍNAS OXIDADAS EN PLASMA.....	151
3.6. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPs) EN FRÁGILES Y NO FRÁGILES.....	155
3.6.1. EVALUACIÓN GENERAL.....	155
3.6.2. ANÁLISIS INDIVIDUAL: SNPs RELACIONADOS CON LA FRAGILIDAD	157
3.6.3. ANÁLISIS POR GEN: GENES RELACIONADOS CON LA FRAGILIDAD ...	160
3.6.4. ANÁLISIS POR VÍA DE SEÑALIZACIÓN: VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RELACIONADAS CON LA FRAGILIDAD	162
3.7. RESUMEN DE RESULTADOS DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS.....	166

3.7.1. DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE GRUPOS.....	166
3.7.2. DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN FUNCIÓN DEL SEXO Y LA EDAD ...	167
4. DISCUSIÓN	169
4.1. CONSIDERACIONES GENERALES	171
4.2. FRAGILIDAD Y DEPENDENCIA FUNCIONAL.....	172
4.3. FRAGILIDAD Y DETERIORO COGNITIVO.....	174
4.4. FRAGILIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	177
4.5. FRAGILIDAD Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS	180
4.5.1. ANÁLISIS INDIVIDUAL.....	181
4.5.2. ANÁLISIS POR GEN	185
4.5.3. ANÁLISIS POR VÍA DE SEÑALIZACIÓN.....	187
4.6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	190
5. CONCLUSIONES	193
6. SUMMARY OF RESULTS, DISCUSSION AND CONCLUSIONS	197
6.1. BACKGROUND AND JUSTIFICATION OF THE STUDY	199
6.2. FRAILTY AND FUNCTIONAL DEPENDENCE.....	201
6.3. FRAILTY AND COGNITIVE IMPAIRMENT.....	207
6.4. FRAILTY AND OXIDATIVE STRESS.....	214
6.4.1. LIPID PEROXIDATION DETERMINED BY MEASURING PLASMA MDA LEVELS	215

6.4.2. PROTEIN OXIDATION DETERMINED AS PLASMA PROTEIN CARBONYL LEVELS	219
6.5. FRAILTY AND GENETIC VARIANTS.....	221
6.5.1. INDIVIDUAL ANALYSIS.....	222
6.5.2. GENE ANALYSIS	226
6.5.3. PATHWAY ANALYSYS.....	229
6.6. LIMITATIONS OF THE STUDY	234
6.7. CONCLUSIONS.....	236
7. BIBLIOGRAFÍA	237
8. ANEXOS	267
8.1. ANEXO 1: ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	269
8.2. ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO	274
8.3. ANEXO 3: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA.....	277
8.4. ANEXO 4: MMSE	279
8.5. ANEXO 5: CRITERIOS DE FRAGILIDAD DE FRIED	280
8.6. ANEXO 6: ESCALA PASE	281
8.7. ANEXO 7: ÍNDICE DE KATZ.....	285
8.8. ANEXO 8: ÍNDICE DE LAWTON Y BRODY	286
8.9. ANEXO 9: PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS SNPs RELACIONADOS CON LA FRAGILIDAD	287

8.10. ANEXO 10: ARTÍCULO RELACIONADO CON LA PRESENTE TESIS DOCTORAL 289

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

<i>Figura 1.1. Proyección poblacional española a largo plazo</i>	17
<i>Figura 1.2. Teorías del envejecimiento</i>	20
<i>Figura 1.3. Ciclo de la fragilidad</i>	32
<i>Figura 1.4. Patogénesis del síndrome de fragilidad</i>	37
<i>Figura 1.5. Mecanismos moleculares implicados en la sarcopenia</i>	58
<i>Figura 1.6. Estructura en doble hélice del ADN</i>	64
<i>Figura 1.7. Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)</i>	66
<i>Figura 1.8. Tipos d SNP según su localización</i>	67

2. MATERIALES Y MÉTODOS

<i>Figura 2.1. Material para electroforesis</i>	84
<i>Figura 2.2. Equipo de HPLC para la determinación de los niveles de MDA</i>	85
<i>Figura 2.3. Esquema del diseño del ETES</i>	88
<i>Figura 2.4. Distribución de la muestra para datos bioquímicos</i>	100
<i>Figura 2.5. Programación de la duración (minutos) de las Fases A y B, durante un cromatograma del análisis de Malondialdehido (MDA)</i>	104
<i>Figura 2.6. Cromatograma de una muestra problema</i>	105
<i>Figura 2.7. Ejemplo de recta patrón para la determinación de la concentración de proteínas en mg/mL (eje de las x) en función de la absorbancia a $\lambda = 660 \text{ nm}$.</i>	108
<i>Figura 2.8. Esquema electroforesis SDS-PAGE</i>	110
<i>Figura 2.9. Unión específica antígeno anticuerpo en el método ELISA</i>	113

3. RESULTADOS

<i>Figura 3.1. Distribución por grupos según el sexo de la muestra</i>	127
<i>Figura 3.2. Puntuación media obtenida en el índice de Katz en individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles</i>	131
<i>Figura 3.3. Puntuación media obtenida en el índice de Katz en individuos prefrágiles y frágiles en función del sexo</i>	132
<i>Figura 3.4. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables índice de Katz y edad</i>	133
<i>Figura 3.5. Puntuación media obtenida en el índice de Lawton y Brody en individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles</i>	135
<i>Figura 3.6. Puntuación media obtenida en el índice de Lawton en individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles en función del sexo</i>	136

Figura 3.7. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables índice Lawton y Brody y edad. 137

Figura 3.8. Puntuación media obtenida en la escala MMSE en individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles. 140

Figura 3.9. Puntuación media obtenida en la escala MMSE en individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles en función del sexo. 141

Figura 3.10. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables escala MMSE y edad. 142

Figura 3.11. Niveles promedio de BDNF en plasma en individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles 144

Figura 3.12. Niveles promedio de BDNF en plasma en individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles en función del sexo. 145

Figura 3.13. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables niveles de BDNF en plasma y edad. 146

Figura 3.14. Niveles promedio de MDA en plasma en individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles 148

Figura 3.15. Niveles promedio de MDA en plasma en individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles en función del sexo. 149

Figura 3.16. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables niveles de MDA en plasma y edad. La n indica el número total de sujetos. 150

Figura 3.17. Niveles promedio de proteínas oxidadas en plasma en individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles 152

Figura 3.18. Niveles promedio de proteínas oxidadas en plasma en individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles en función del sexo 153

Figura 3.19. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables niveles de proteínas oxidadas y edad 154

Figura 3.20. Esquema del proceso de triple análisis de SNPs 157

6. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Figure 6.1. Mean score obtained in the Katz index by non-frail, prefrail and frail individuals 203

Figure 6.2 Mean score obtained in the Katz index by non-frail, prefrail and frail individuals by gender 203

Figure 6.3. Pearson’s correlation coefficient and Scatter Plot of Katz Index and age. 204

Figure 6.4. Mean score obtained in the Lawton and Brody index by non-frail, prefrail and frail individuals 205

Figure 6.5. Mean score obtained in the Lawton and Brody index by non-frail, prefrail and frail individuals by gender 206

Figure 6.6. Pearson's correlation coefficient and Scatter Plot of Lawton and Brody Index and age..... 207

Figure 6.7. Mean score obtained in the MMSE scale by non-frail, prefrail and frail individuals..... 209

Figure 6.8. Mean score obtained in the MMSE scale by non-frail, prefrail and frail individuals by gender..... 210

Figure 6.9. Pearson's correlation coefficient and Scatter Plot of MMSE Scale and age. ... 210

Figure 6.10. Plasma BDNF levels in non-frail, prefrail and frail individuals..... 212

Figure 6.11. Plasma BDNF levels in non-frail, prefrail and frail individuals by gender 213

Figure 6.12. Pearson's correlation coefficient and Scatter Plot of plasma BDNF levels and age..... 213

Figure 6.13. Plasma MDA levels in non-frail, prefrail and frail individuals..... 216

Figure 6.14 Plasma MDA levels in non-frail, prefrail and frail individuals by gender 217

Figure 6.15. Pearson's correlation coefficient and Scatter Plot of plasma MDA levels and age..... 218

Figure 6.16. Plasma carbonylated protein levels in non-frail, prefrail and frail individuals..... 219

Figure 6.17. Plasma carbonylated protein levels in non-frail, prefrail and frail individuals by gender..... 220

Figure 6.18. Pearson's correlation coefficient and Scatter Plot of plasma carbonylated protein levels and age..... 220

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

<i>Tabla 1.1. Criterios necesarios para una definición válida de fragilidad</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 1.2. Biomarcadores de fragilidad propuestos</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 1.3. Especies activadas del oxígeno y nitrógeno</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 1.4. Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas.....</i>	<i>52</i>

2. MATERIALES Y MÉTODOS

<i>Tabla 2.1. Etapas del estudio.....</i>	<i>90</i>
---	-----------

3. RESULTADOS

<i>Tabla 3.1. Edad media de la muestra (por grupos).....</i>	<i>128</i>
<i>Tabla 3.2. IMC medio de la muestra (por grupos)</i>	<i>128</i>
<i>Tabla 3.3. Estadísticos descriptivos para la variable índice de Katz, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil).....</i>	<i>129</i>
<i>Tabla 3.4. Estadísticos descriptivos para la variable índice de Lawton, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil).....</i>	<i>134</i>
<i>Tabla 3.5. Estadísticos descriptivos para la variable escala MMSE, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil).....</i>	<i>139</i>
<i>Tabla 3.6. Estadísticos descriptivos para la variable niveles de BDNF en plasma, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil).....</i>	<i>143</i>
<i>Tabla 3.7. Estadísticos descriptivos para la variable niveles de MDA en plasma, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil).....</i>	<i>147</i>
<i>Tabla 3.8. Estadísticos descriptivos para la variable proteínas oxidadas en plasma, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil).....</i>	<i>151</i>
<i>Tabla 3.9. SNPs asociados a la fragilidad ($p < 0.001$), obtenidos mediante el software Plink, analizando variantes raras y comunes con el modelo aditivo.</i>	<i>158</i>
<i>Tabla 3.10. Genes asociados a la fragilidad en el estudio de SNPs ($p < 0.005$) mediante el test SKAT, empleando la librería skatMeta de R.....</i>	<i>161</i>
<i>Tabla 3.11. Vías de señalización asociadas a la fragilidad en el estudio de SNPs ($p < 0.05$), obtenidas mediante el software PLINK.....</i>	<i>164</i>
<i>Tabla 3.12. Resumen de las diferencias entre grupos de las diferentes variables estudiadas.....</i>	<i>166</i>
<i>Tabla 3.13. Resumen de la relación entre las diferentes variables estudiadas y el sexo y la edad del sujeto.....</i>	<i>167</i>

6. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Table 6.1. Proposed biomarkers of frailty..... 200

Table 6.2. SNPs associated with frailty ($p < 0.001$). Rare and common variants analysis was performed by the PLINK software, using the additive model. 223

Table 6.3. Genes associated to frailty based on the presence of at least two SNPs ($p < 0.005$). Data analysis was performed by the SKAT test, using the R package skatMeta..... 227

Table 6.4. Pathways associated to frailty, based on the presence of SNPs ($p < 0.05$). Data analysis was performed by the PLINK software..... 230

ABSTRACT/ RESUMEN

ABSTRACT

In the last two decades, the proportion of people aged over 60 years is growing faster than any other age group, as a result of both longer life expectancy and declining fertility rates. As a consequence, the population is growing older and therefore there is an increasing interest in ageing and how to face age-related problems. Most of the research in this area has so far focused on survival and the plausible interventions to increase lifespan. Recently, however, emphasis has shift to preventing disability (*healthspan*), rather than merely increasing longevity (*lifespan*).

In this context, age-associated frailty has emerged as a geriatric syndrome, characterized by a decline in physiologic reserve and function across systems, leading to increased vulnerability and low capacity to cope with external stressors. Even if there is no consensus on the definition of frailty, it is clear that this condition can lead to increasing disability, institutionalization, and even death.

The most frequently employed criteria of frailty are those defined by Linda Fried: involuntary weight loss, self-reported exhaustion, low physical activity, slowness, and low grip strength. However, these criteria are excessively focused on the musculoskeletal system and may overlook any relationship between these pathophysiological changes and the presence of cognitive impairment, the other major source of disability and frailty.

One of the most important features of frailty, from the medical point of view, is that it refers to a dynamic condition, which means that not all individuals are frail in the same way, and moreover, a frail individual can become non-frail, if

frailty is detected and treated at the onset. Therefore, a great deal of attention has been focused on finding good biomarkers to help in the diagnosis of frailty and to prevent adverse outcomes. In this regard, frailty has been linked to some biomarkers, related to the neuroendocrine, immune, cardiovascular or musculoskeletal system or metabolism. Frailty has also been associated with oxidative stress markers, such as 8-Hydroxy-2-deoxy Guanosine (8-oxodG) oxidized glutathione/reduced glutathione (GSSG/GSH) ratio, malondialdehyde (MDA), and 4-hydroxy-2,3-nonenal (HNE) in plasma. Recently, it has also been associated to brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin whose functions are related to neuronal survival/proliferation processes, inflammation and physical activity. Likewise, some genetic variants have been associated with frailty. However, all these associations were not clearly established.

The aim of this doctoral thesis was to ascertain whether frailty is indeed related to functional dependence and cognitive impairment in the Toledo Study for Healthy Aging (TSHA), as well as to provide some reliable biomarkers of frailty related to cognitive status, oxidative stress and genetic variation, which may help in the multidisciplinary health-promoting approach for frail adults.

For this purpose, a representative sample of 776 people was randomly selected from the TSHA, a longitudinal population-based cohort of 2,488 community dwelling people from Toledo (Spain), aged 65 and over. The sample included 423 non frail (244 women and 179 men), 288 prefrail (168 women and 120 men) and 65 frail individuals (44 women and 21 men).

First, we investigated if frailty was associated with functional dependence, both in basic activities of daily living (ADL) and instrumental activities of daily living (AIDL). For ADL, we compared the average scores obtained for the Katz

Index between non frail, prefrail and frail individuals. We found that indeed frail individuals were more dependent than prefrail and non frail. Prefrail individuals were also more dependent than non frail. We also investigated whether gender or age could be mediating our results. Interestingly, no differences between men and women in the Katz index score within any group nor a strong correlation between such score and age was found, thus suggesting that the lowest score in the Katz index, and thus functional dependence in ADL, depends on frailty status, rather than gender or age.

In the case of AIDL, we compared the average score obtained for the Lawton Index between non frail, prefrail and frail individuals. We found that frail individuals were more dependent than prefrail and non frail. Prefrail individuals were also more dependent than non frail. Once again, the potential influence of gender or age on this index score was investigated. In this case, we found that men were more dependent than women, but a strong correlation between the Katz index score and age did not exist, thus suggesting that functional dependence in IADL relies on frailty status and gender, but not age.

Next, we aimed to define if frailty was related to cognitive impairment. For this purpose, we compared the average score obtained for the Mini-Mental State Examination of Folstein (MMSE) between non frail, prefrail and frail individuals. This allowed us to observe that indeed frail individuals were more cognitively-impaired than prefrail and non frail. Prefrail individuals were also more cognitively-impaired than non frail. We also investigated whether gender or age may have any influence on our results. As was the case for the katz Index, no differences between men and women in MMSE index score within any group nor a strong correlation between such score and age was found, thus suggesting again

that the lowest score in the MMSE index, and thus cognitive impairment, depends on frailty status, rather than gender or age.

The next step was to study if frailty was related to a cognitive impairment-related biomarker, called brain-derived neurotrophic factor (BDNF). To achieve this objective, plasma BDNF levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and were further compared between non frail, prefrail and frail individuals. We observed that frail individuals displayed lower plasma BDNF levels than non frail, which has been associated to cognitive impairment. Once again, the possible influence of gender and age on these results was examined, and we found that neither gender nor age was related to plasma BDNF levels. Taken together, these findings suggest that plasma BDNF levels depend on frailty status, rather than gender or age.

In addition, we aimed to assess if frailty was associated to changes in oxidative stress biomarkers. In this regard, we determined plasma levels of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography (HPLC) and carbonylated proteins by Western blotting in our population, as indicators of lipid and protein damage, respectively. Furthermore, since gender and age have been traditionally considered to be key factors influencing oxidative stress parameters, their possible effect on these biomarkers were studied again.

Regarding to MDA levels, we found that frail people displayed higher plasma MDA levels than prefrail and non frail. However, such levels were not different between men and women within any group (non frail, prefrail, frail), nor were they related to the age of the individuals. These results suggest that plasma MDA levels, and thus oxidative damage to lipids, depend on frailty status, rather than gender or age.

When studying protein carbonylation levels, we could observe that both frail and prefrail people showed higher plasma levels of protein carbonyls than non frail. Interestingly though, plasma protein levels were again not different between men and women in any group, nor were they related to the age of the individuals. This may suggest that protein carbonylation, and thus oxidative damage to proteins is related to frailty status, and not to gender or age.

Finally, we studied the possible influence of genetic variation on this multisystemic syndrome, through the identification of common variants (known as single nucleotide polymorphisms or SNPs) and rare variants. For this purpose we genotyped 295,988 SNPs and rare variants using Axiom®Exome Genotyping Arrays (Affymetrix). After applying the quality control filtering, 41,828 SNPs remained appropriate for the current study. We performed three different types of analysis: individual, gene and pathway. Interestingly, we found SNPs and rare variants in genes or pathways related to important physiopathological processes, such as the musculoskeletal system, cognitive function, energetic metabolism, stress response and apoptosis.

Taken together, our findings indicate that frailty is related to functional dependence and cognitive impairment in the TSHA. Furthermore, we have found that frailty is related to biomarkers related to cognitive function, oxidative stress and genetic variations. Thus, these biomarkers may be useful in detecting frailty, and this would open up the possibility of early detection, testing the efficacy of intervention aimed at treating frailty and preventing its progression to disability.

RESUMEN

Debido al aumento de la esperanza de vida y a la disminución de la tasa de fecundidad producido en las últimas décadas, la proporción de personas mayores de 60 años está aumentando más rápidamente que cualquier otro grupo de edad. Este envejecimiento de la población ha suscitado un gran interés en el estudio del envejecimiento y en cómo hacer frente a los problemas relacionados con él. Tradicionalmente, la mayor parte de la investigación en este ámbito se ha centrado en la supervivencia y en las posibles intervenciones para prolongar la esperanza de vida. Sin embargo, la tendencia actual es a considerar más importante la prevención de la discapacidad (*healthspan*) que el simple aumento de la longevidad (*lifespan*).

En este contexto, surge el concepto de fragilidad, un síndrome geriátrico caracterizado por una disminución de las reservas fisiológicas y la función de múltiples sistemas, lo cual conlleva una mayor vulnerabilidad y baja capacidad para hacer frente a las agresiones externas. Además, la condición de fragilidad aumenta el riesgo de discapacidad, institucionalización e incluso muerte.

Los criterios de fragilidad más empleados son los definidos por Linda Fried: pérdida involuntaria de peso en el último año, sentimiento de agotamiento general referido por el propio paciente, lentitud de la marcha, bajo nivel de actividad física y disminución de la fuerza de agarre. Sin embargo, estos criterios se centran demasiado en el sistema músculo-esquelético y metabólico y podrían obviar la relación entre estos cambios fisiopatológicos y la presencia de deterioro cognitivo, otra fuente importante de discapacidad y fragilidad.

Una de las características más importantes de la fragilidad, desde el punto de vista médico, es que se refiere a una condición dinámica, es decir, no todos los individuos son frágiles de la misma manera y, por otra parte, un individuo frágil puede llegar a no serlo, si dicha fragilidad es detectada y tratada de manera precoz. Por ello, en los últimos años, la búsqueda de biomarcadores que ayuden a su diagnóstico e incluso a su prevención ha cobrado especial importancia. En este sentido, la fragilidad se ha relacionado con algunos biomarcadores relacionados con el sistema neuroendocrino, inmunológico, cardiovascular, músculo-esquelético y metabólico. Así mismo, se ha asociado con algunos marcadores de estrés oxidativo, tales como la 8-Hidroxi-2'-desoxi guanosina (8-oxodG), el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH), el malondialdehído (MDA), y el 4-hidroxi-2, 3 - nonenal en el plasma. Recientemente, también se ha asociado con el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), una neurotrofina cuyas funciones están relacionadas con procesos de supervivencia/proliferación neuronal, inflamación y actividad física. Del mismo modo, algunas variantes genéticas se han asociado con la fragilidad. Sin embargo, todas estas relaciones no se han establecido claramente.

El objetivo de esta tesis doctoral fue determinar si la fragilidad está relacionada con la dependencia funcional y el deterioro cognitivo en el Estudio de Toledo de Envejecimiento Saludable (ETES), así como identificar biomarcadores de fragilidad relacionados con el estado cognitivo, el estrés oxidativo y la variación genética, lo cual podría ayudar en el enfoque multidisciplinar hacia la promoción de la salud del paciente frágil.

Para ello, se seleccionaron 776 personas del ETES, un estudio longitudinal de base poblacional formado por 2488 individuos mayores de 65 años y residentes en Toledo (España). La muestra incluyó a 423 sujetos no frágiles (244

mujeres y 179 hombres), 288 prefrágiles (168 mujeres y 120 hombres) y 65 frágiles (44 mujeres y 21 hombres).

En primer lugar, se estudió si la fragilidad se asociaba con dependencia funcional, tanto para las actividades básicas de la vida diaria (ABVD), como las instrumentales (AIVD). En el primer caso, se compararon las puntuaciones promedio obtenidas en el índice de Katz entre individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles, observando que los individuos frágiles eran más dependientes para dichas actividades que los prefrágiles y los no frágiles, y que los prefrágiles eran también más dependientes que los no frágiles. Además, se investigó si el género o la edad podrían estar mediando dichos resultados. En este sentido, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en la puntuación obtenida en el índice de Katz en ninguno de los grupos estudiados, ni una fuerte correlación entre dicha puntuación y la edad. Estos resultados sugieren que la puntuación más baja en el índice de Katz, y por lo tanto la dependencia funcional para las ABVD, depende de la condición de fragilidad, y no del sexo o la edad.

En el caso de las AIDL, se comparó la puntuación media obtenida en el índice de Lawton entre no frágiles, prefrágiles y frágiles, observando que los individuos frágiles eran más dependientes que los prefrágiles y los no frágiles, y que los prefrágiles eran también más dependientes que los no frágiles. Nuevamente, se investigó la posible influencia del sexo o la edad sobre los resultados obtenidos para este índice. En este caso, se observó que los hombres eran más dependientes que las mujeres, pero no existía una fuerte correlación entre la puntuación del índice de Lawton y la edad, lo cual sugiere que la dependencia funcional en AIVD depende de la condición de fragilidad y del género, pero no de la edad.

A continuación, se estudió si la fragilidad estaba relacionada con deterioro cognitivo. Para ello, se compararon las puntuaciones medias obtenidas en el *Mini-Mental State Examination* de Folstein (MMSE) entre no frágiles, prefrágiles y frágiles. De este modo, se observó que los individuos frágiles presentaban un mayor deterioro cognitivo que los prefrágiles y los no frágiles, y que los prefrágiles también presentaban un mayor deterioro cognitivo que los no frágiles. También investigamos si el género o la edad podían tener alguna influencia en dichos resultados. Tal y como sucedió con el índice de Katz, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en la puntuación obtenida en el MMSE en ningún grupo, ni una fuerte correlación entre dicha puntuación y la edad, lo cual sugiere una vez más que la puntuación más baja en el índice de MMSE, y por lo tanto el deterioro cognitivo, depende de la condición de fragilidad, y no del sexo o la edad.

El siguiente paso fue estudiar si la fragilidad se relacionaba con un biomarcador asociado al deterioro cognitivo, llamado factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Para ello, se midieron los niveles plasmáticos de BDNF mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y se compararon posteriormente dichos niveles entre frágiles, prefrágiles y frágiles. De este modo, se pudo observar que los individuos frágiles mostraban menores niveles de BDNF en plasma que los no frágiles, lo cual se ha asociado con el deterioro cognitivo. Una vez más, se analizó la posible influencia del género y la edad en estos resultados, encontrando que ni el género ni la edad se relacionaban con los niveles de BDNF en plasma. Estos resultados sugieren que los niveles de BDNF en plasma dependen de la condición de fragilidad, y no del sexo o la edad.

Por otro lado, se estudió la posible relación entre fragilidad y biomarcadores de estrés oxidativo. En este sentido, se determinaron los niveles

plasmáticos de MDA por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y de proteínas carboniladas por *Western blotting*, como indicadores de daño a lípidos y a proteínas, respectivamente. Además, dado que el género y la edad han sido considerados tradicionalmente como factores clave que pueden influir en parámetros de estrés oxidativo, se estudió de nuevo su posible efecto sobre estos biomarcadores.

En cuanto a los niveles de MDA, se encontró que las personas frágiles mostraban mayores niveles plasmáticos de MDA que las prefrágiles y las no frágiles. Sin embargo, no se observaron diferencias en dichos niveles entre hombres y mujeres en ningún grupo (no frágil, prefrail, frágil), ni una correlación con la edad de los individuos. Estos resultados sugieren que los niveles de MDA en plasma, y por lo tanto el daño oxidativo a lípidos, dependen del estado de fragilidad, y no del sexo o la edad.

Al estudiar los niveles de carbonilación de proteínas, pudimos observar que tanto los individuos frágiles como los prefrágiles presentaban mayores niveles de carbonilación proteica en plasma que los no frágiles. Además, tal y como sucedió con el MDA, los niveles de proteínas carboniladas en plasma no fueron diferentes entre hombres y mujeres en ningún grupo, ni tampoco estaban relacionados con la edad de los individuos. Esto podría indicar que la carbonilación de proteínas, y por lo tanto el daño oxidativo a las mismas, está relacionada con la condición de fragilidad, y no con el sexo o la edad.

Por último, se estudió la posible influencia de la variación génica sobre este síndrome multisistémico, a través del análisis de variantes comunes (también llamadas polimorfismos de nucleótido simple o SNPs) y variantes raras. Para ello, se genotiparon 295988 SNPs y variantes raras utilizando la tecnología

Axiom[®]*exome genotyping* de Affymetrix. Tras aplicar un exhaustivo control de calidad, quedaron 41828 SNPs para el presente estudio. Se realizaron tres tipos de análisis: individual, por genes y por vías de señalización. De esta manera, encontramos SNPs y variantes raras en genes o vías de señalización relacionadas con importantes procesos fisiopatológicos, tales como el sistema músculo-esquelético, la función cognitiva, el metabolismo energético, la respuesta al estrés o la apoptosis.

Como conclusión, nuestros resultados muestran cómo la fragilidad se relaciona con dependencia funcional y deterioro cognitivo en el ETES. Además, hemos identificado biomarcadores de fragilidad relacionados con la función cognitiva, el estrés oxidativo y la variación génica. Por tanto, estos biomarcadores podrían ser útiles en la detección temprana de la fragilidad, lo cual permitiría probar la eficacia de intervenciones dirigidas su tratamiento y, de este modo, prevenir su progresión hacia la discapacidad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. ENVEJECIMIENTO

1.1.1.1. Concepto de envejecimiento

Actualmente no disponemos de una definición aceptada de manera universal del concepto envejecimiento. El gerontólogo Denham Harman lo define como la “acumulación progresiva de cambios deletéreos en células y tejidos con el tiempo, que provocan el aumento de probabilidad de enfermedad y muerte del individuo” (Harman D., 2001; Troen B.R., 2003).

Por otro lado, Bernard Strehler (Strehler B.L., 1985), lo define a través de cuatro postulados:

- El envejecimiento es **universal**, es decir, un fenómeno dado asociado al proceso de envejecimiento debe darse en menor o mayor medida en todos los individuos de una misma especie.
- El envejecimiento es **intrínseco**, por lo que las causas que lo provocan deben de ser de origen endógeno, no dependiendo de factores externos o de origen ambiental.
- El envejecimiento es **progresivo**, ya que los cambios que conducen a envejecer se dan de manera paulatina a lo largo de la vida.
- El envejecimiento es **deletéreo**, de tal manera que un determinado fenómeno sólo se considerará parte del proceso de envejecer si es dañino.

Debido al aumento de la esperanza de vida y a la disminución de la tasa de fecundidad, la proporción de personas mayores de 60 años está aumentando más rápidamente que cualquier otro grupo de edad en los países desarrollados. Según la organización mundial de la salud (OMS), el envejecimiento de la población puede considerarse un éxito de las políticas de salud pública y del desarrollo socioeconómico, pero también constituye un reto para la sociedad, que debe adaptarse a ello para mejorar al máximo la salud y la capacidad funcional de las personas mayores, así como su participación social y seguridad. La esperanza de vida en países como Japón y Francia ya era superior a 80 años en 2005, y también está aumentando en los países en desarrollo: un niño que nazca hoy en Chile, Costa Rica, Jamaica, Líbano, Sri Lanka o Tailandia puede vivir más de 70 años. No obstante, sigue habiendo grandes desigualdades, como demuestran las diferencias con respecto a la esperanza de vida al nacer; por ejemplo, mientras que en Japón, el país con mayor esperanza de vida, es de 82.2 años, en varios países africanos la cifra puede llegar a ser de 40 años menos. También existen importantes desigualdades dentro de un mismo país; por ejemplo, en los Estados Unidos de América los grupos socioeconómicos más favorecidos tienen una esperanza de vida hasta 20 años mayor que los menos favorecidos (OMS, 2011). Con respecto a España, según datos del observatorio de sostenibilidad de España (OSE), la esperanza de vida al nacer ha ido aumentando progresivamente con los años. En el caso de los hombres, ésta ha pasado de los 76.3 años en el año 2002 a los 78.9 en el año 2010 y, en el caso de las mujeres, de los 83.2 años en 2002 a los 84.8 en el año 2010 (OSE, 2010). De hecho, según datos del instituto nacional de estadística (INE), las personas de más de 65 años actualmente representan el 17.06% de la población española, y se prevé que esta proporción se duplique en los próximos 40 años (INE, 2012), debido a un envejecimiento de la pirámide poblacional, tal y como muestra la Figura 1.1.

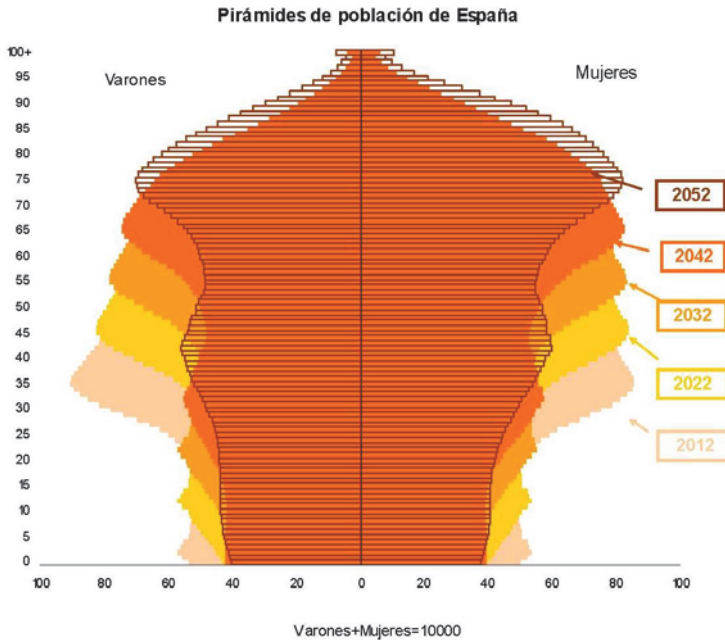


Figura 1.1. Proyección poblacional española a largo plazo (INE, 2012)

Ante este envejecimiento de la población, producido en parte debido al interés de los humanos por vivir el mayor número posible de años, unido al creciente desarrollo de la ciencia y la técnica, se plantea la tendencia actual que considera que si lo importante es vivir más años, es esencial que estos transcurran con la mejor calidad de vida posible. Esta problemática ha adquirido primordial importancia y se ha convertido en un factor decisivo en las investigaciones médicas y sociales (Mussol J., 2002).

1.1.1.2. Tipos de envejecimiento

El envejecimiento humano es el resultado de la suma de dos subtipos de envejecimiento: el envejecimiento primario o *per se* y el envejecimiento secundario (Mañas R., 2001).

- **Envejecimiento primario:** proceso o conjunto de procesos responsables de una serie de cambios graduales observados con la edad en los individuos, los cuales son inevitables y no están relacionados con la presencia de enfermedad. La investigación se centra en los mecanismos genéticos, moleculares y celulares que intervienen en el envejecimiento como proceso (Finch C.E. y Tanzi R.E., 1997; Halliwell B., 2000).
- **Envejecimiento secundario:** es aquel que se produce en los seres vivos cuando estos se ven sometidos a diferentes fenómenos externos, que ocurren a lo largo de la vida y que interactúan con los mecanismos y cambios propios del envejecimiento primario para producir el llamado “envejecimiento habitual”. Los principales representantes de este envejecimiento secundario son los problemas crónicos de salud y los cambios adaptativos para mantener la homeostasis del medio interno. Dado que estos fenómenos no se correlacionan con la edad, es difícil establecer su curso normal. Su investigación abarca tanto la causa, prevención, desarrollo, manifestación, pronóstico y tratamiento de la enfermedad y de sus consecuencias, como lo relacionado con hábitos y estilos saludables de vida (De la Fuente C., 2001).

La característica fundamental que puede derivarse de cualquiera de estos dos tipos de envejecimiento es la pérdida de la reserva funcional del individuo, lo cual condiciona una mayor susceptibilidad ante agresiones externas, al disminuir los mecanismos de respuesta y su eficacia para mantener la homeostasia del medio interno (Hayflick L., 2000). Según se pierde la reserva funcional la susceptibilidad es mayor, aumentando la posibilidad de que cualquier causa

desencadene en una pérdida de función y, en última instancia, en discapacidad y dependencia (Buchner D.M. y Wagner E.H., 1992; Mañas R., 2001).

Por eso, a lo largo de los últimos años, ha existido un interés creciente por perseguir el llamado “envejecimiento exitoso” (del inglés, *successful aging*), que se caracteriza por (Rowe J.W. y Kahn R.L., 1997):

- Ausencia o baja probabilidad de enfermedad y discapacidad asociada a la misma.
- Mantenimiento de una alta capacidad cognitiva y funcional.
- Mantenimiento de un compromiso activo con la vida.

Estas premisas permiten que la persona mayor siga participando de la sociedad, lo cual se conoce como **envejecimiento activo**. Éste fue definido por la OMS como el “proceso por el cual se optimizan las oportunidades de bienestar físico, social y mental durante toda la vida con el objetivo de ampliar la esperanza de vida saludable, la productividad y la calidad de vida en la vejez”. El envejecimiento activo trata de ampliar la esperanza de vida saludable y la calidad de vida a todas las personas a medida que envejecen, incluyendo aquellas personas frágiles, discapacitadas o que necesitan asistencia (OMS, 2002). Para ello, es indudable la necesidad de encontrar estrategias que ayuden a la detección de los sujetos de riesgo.

1.1.1.3. Teorías de envejecimiento

Son muchas las teorías que tratan de dar una explicación al fenómeno del envejecimiento primario o envejecimiento como proceso (Figura 1.2). Dado que actualmente no se conocen exactamente las causas que lo provocan, no existe una única aceptada, sino que cada una intenta aportar una explicación

teóricamente lógica de dicho proceso.

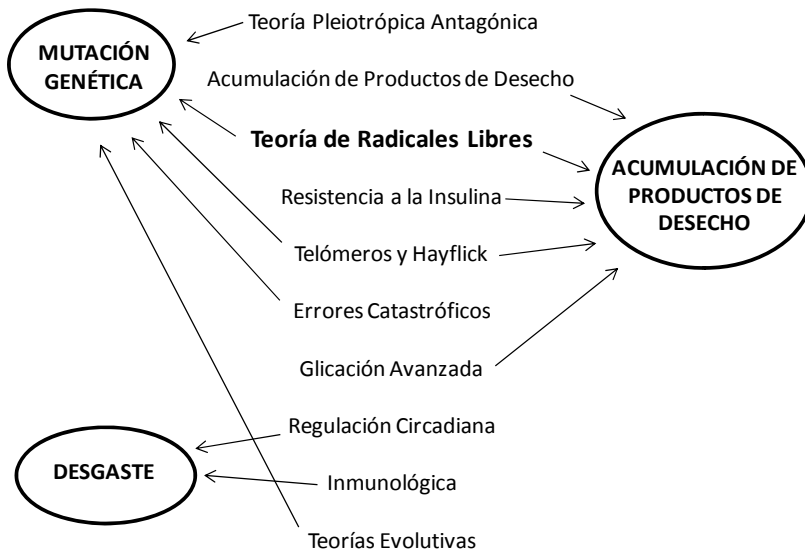


Figura 1.2. Teorías del envejecimiento (Viña J. et al., 2007)

Dada la relevancia en la presente tesis, nos centraremos en la teoría de los radicales libres.

❖ Teoría de los Radicales libres

La Teoría de los Radicales Libres propone que los radicales libres derivados de oxígeno (que serán explicados posteriormente) son los responsables del daño oxidativo asociado a la edad. Los sistemas antioxidantes no son capaces de hacer frente a todas las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan continuamente a lo largo de la vida de la célula, lo cual acaba provocando un daño oxidativo en ella y, por extensión, sobre los tejidos (Harman D., 1956).

En su interpretación más estricta, esta teoría predice que una reducción del estrés oxidativo, sea mediante la reducción de la carga prooxidante, el aumento de las defensas antioxidantes, o la combinación de ambas, deberían aumentar la vida útil (Salmon A.B. *et al.*, 2010).

Existen numerosas pruebas experimentales a favor de esta teoría. Los animales viejos presentan mayores índices de oxidación que los jóvenes, acumulando así tanto proteínas oxidadas como formas oxidadas del ácido desoxirribonucleico (ADN) y de lípidos (Stadman E.R., 1992; Sohal R.S., 1993; Bokov A. *et al.*, 2004). Este hecho sugiere una mayor tasa de producción de ROS por parte de los organismos viejos. Además, numerosos estudios realizados en diversos organismos, sugieren que la reducción del estrés oxidativo o el aumento de la resistencia al mismo, están relacionados con la prolongación de la vida (Miquel J. *et al.*, 1980; Viña J. *et al.*, 1992; Orr W.C. y Sohal R.S., 1994; Finkel T. y Holbrook N.J., 2000; Ishii N. *et al.*, 2004; Quick K.L. *et al.*, 2008; Schlernitzauer A. *et al.*, 2013).

Por otra parte, entre el 1-2% de los electrones que circulan a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, no llegan a reducir el oxígeno para formar agua, sino que dan lugar a un radical libre, el anión superóxido, el cual a su vez puede ser dismutado a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por la superóxido dismutasa (SOD), pudiendo salir de la mitocondria y oxidar a otras moléculas (Boveris A. y Chance B.C., 1973; Chance B. *et al.*, 1979). De esta manera, como veremos posteriormente, la mitocondria es la principal fuente endógena de radicales libres (Finkel T. y Holbrook N.J., 2000; Balaban R.S. *et al.*, 2005). Por ello, se propone la **Teoría Mitocondrial del Envejecimiento Celular**, en la cual se sugiere que la senescencia es un producto derivado del ataque de los radicales libres de oxígeno al genoma mitocondrial en células postmitóticas fijadas (Miquel

J. *et al.*, 1980). Las mitocondrias de las células postmitóticas consumen O₂ a velocidades altas, liberando entonces radicales de oxígeno que exceden la capacidad de las defensas antioxidantes celulares (Miquel, J. y Fleming, J. 1986). De este modo, diversos autores han comprobado que las mitocondrias de animales viejos producen más radicales libres que las de los jóvenes (Sohal R.S. *et al.*, 1990; Sastre J. *et al.*, 1996), produciendo un daño oxidativo al ADN mitocondrial, proteínas y lípidos (Richter C. *et al.*, 1988; Shigenaga M.K. *et al.*, 1994; Benzi G. y Moretti A., 1995; Sastre J. *et al.*, 1996; Sastre J. *et al.*, 1998). Además, existe una relación inversa entre la producción mitocondrial de H₂O₂ y la longevidad de diversas especies (Sohal R.S. y Sohal B.H., 1991; Barja G., 2002; Lambert A.J. *et al.*, 2007).

Desde su enunciado, tanto la Teoría del Envejecimiento por Radicales Libres como la Teoría Mitocondrial de Envejecimiento resultaron especialmente atractivas, debido a que permitían una intervención racional para retardar el daño que acompaña al proceso de envejecer, por ejemplo, la administración de antioxidantes.

Sin embargo, en los últimos años, ambas teorías han sido cuestionadas (Lapointe J. y Hekimi S., 2010; Liu Y. *et al.*, 2014), a la luz de diferentes estudios que han generado ambigüedad y controversia alrededor de las mismas. Así, algunos autores han encontrado una correlación negativa entre la producción mitocondrial de ROS y la longevidad de varias especies (Brunet-Rossinni A.K., 2004; Lambert A.J. *et al.*, 2007). Además, se ha visto que la sobreexpresión de enzimas antioxidantes o la administración de sustancias antioxidantes no siempre prolonga la vida en ratones (Huang T.T. *et al.*, 2000; Perez V.I. *et al.*, 2009; Sadowska-Bartosz I. y Bartosz G., 2014). Tampoco ha sido demostrado en ensayos clínicos que la administración de sustancias antioxidantes disminuya la incidencia

de eventos adversos (como el cáncer o enfermedades cardiovasculares) o prolongue la vida en humanos (Howes R.M., 2006; Bjelakovic G. *et al.*, 2007).

Recientemente, desde nuestro laboratorio, se ha propuesto la “teoría de la alteración en la señalización celular”, que intenta matizar las dos anteriores (Viña J. *et al.*, 2013). Esta teoría postula que los radicales libres son causa de envejecimiento, en la medida en que alteren el funcionamiento normal de las vías de señalización celular. Si las células pueden afrontar el estrés causado por dosis leves de ROS, tendrá lugar una adaptación y no se producirá ningún daño. Sin embargo, si la célula se ve invadida por la acción de los radicales libres, tendrá lugar el daño y envejecimiento celular. Por tanto, el envejecimiento, según esta teoría, aparecería como consecuencia de una alteración de toda la red de señalización celular en la que están implicados los radicales libres.

1.1.1.4. Valoración geriátrica integral

Las características especiales del paciente geriátrico, en el que confluyen los aspectos fisiológicos del envejecimiento y la gran variabilidad en cuanto a formas de presentación de la enfermedad, hacen necesaria la aplicación de un sistema especial de valoración (Redín J.M., 1999). La valoración geriátrica integral (VGI) surge como respuesta a la alta prevalencia en el anciano de necesidades y problemas no diagnosticados, de disfunciones y dependencias reversibles no reconocidas, que se escapan a la valoración clínica tradicional (anamnesis y exploración física).

Es un proceso diagnóstico dinámico y estructurado que permite detectar y cuantificar los problemas, necesidades y capacidades del anciano en las esferas clínica, funcional, mental y social. Además, esta valoración permite elaborar una

estrategia interdisciplinar de intervención, tratamiento y seguimiento a largo plazo, con el fin de optimizar los recursos y lograr el mayor grado de independencia y, en definitiva, calidad de vida (Rubenstein L.Z., 1987).

La VGI incluye la valoración de cuatro esferas: la clínica, la mental, la social y la funcional, las cuales configuran, una vez enlazadas, la imagen real de salud del anciano.

Los principales elementos que incluye una correcta VGI son la anamnesis, la exploración física y una serie de instrumentos más específicos denominados “escalas de valoración” que facilitan la detección y seguimiento de problemas, así como la comunicación entre los diferentes profesionales que atienden al mayor (Ariño S. y Benavent R., 2002).

Con respecto a la esfera funcional y mental, en un estudio descriptivo transversal se analizaron las principales escalas de valoración empleadas en 39 servicios de geriatría y equipos de valoración y cuidados geriátricos de España (Abizanda P. *et al.*, 2000). De esta manera, se concluyó que todos los servicios consultados empleaban, en mayor o menor medida, escalas de valoración funcional y mental, pero que no existía un consenso en cuanto a cuáles debía emplearse. Las escalas más empleadas para la valoración funcional fueron el “índice de Barthel” (Mahoney F.I. y Barthel D.W., 1965) e “índice de Katz” (Katz S. *et al.*, 1963), para las actividades básicas de la vida diaria (ABVD) y el “índice de Lawton” (Lawton M.P. y Brody E.M., 1969) para las actividades instrumentales de la vida diaria (AIVD). La escala “*Mini-Mental Examination*” de Folstein (MMSE) (Folstein M.F. *et al.*, 1975) fue, así mismo, una de las más empleadas para la valoración mental.

1.1.2. FRAGILIDAD

1.1.2.1. Concepto

Es evidente que no todo el mundo alcanza el envejecimiento satisfactorio del cual hemos hablado antes. De hecho, a menudo, edad cronológica y biológica no se correlacionan (Mitnitski A.B. *et al.*, 2002), de tal manera que individuos de la misma edad cronológica pueden variar mucho en su estado funcional y de salud. En un intento de explicar esta heterogeneidad en la manera de envejecer y de encontrar términos con los cuales identificar aquellos individuos con una capacidad funcional reducida y, por tanto, el aumento de la probabilidad de dependencia, surgen los conceptos de “fragilidad” y “anciano frágil”. Etimológicamente, el término frágil proviene del francés “*frêle*”, que significa “poco resistente”, y del latín “*fragilis*”, que significa “que se rompe con facilidad”.

Así como durante los años 60 y la primera mitad de los 70, se sientan las bases de la VGI, en los años 90 el interés se centra en estos nuevos conceptos de fragilidad y anciano frágil, poniéndose de manifiesto la necesidad de identificar a estos pacientes de riesgo que podrían beneficiarse de ciertas intervenciones socio-sanitarias, fundamentalmente preventivas (Alarcón T. y González Montalvo J.I., 1997; Campbell A.J. y Buchner D.M., 1997; Abizanda P. *et al.*, 2010).

Tal y como sucede con el envejecimiento, no existe una definición universal de fragilidad, existiendo en los últimos años, un interés creciente por encontrarla. De hecho, recientemente, un grupo de 31 expertos en diferentes campos relacionados con la fragilidad, intentaron elaborar una definición lo más concreta y completa posible. Aunque no se pudo llegar a una definición consensuada, se subrayó el carácter multifactorial de esta entidad, así como la

necesidad de incluir múltiples dominios en su valoración (Rodríguez-Mañás L. *et al.*, 2013).

Por tanto, la definición más aceptada actualmente sigue siendo la acuñada por Linda Fried y colaboradores, según la cual, la fragilidad sería el “estado fisiológico caracterizado por un aumento de la vulnerabilidad a las agresiones externas, como resultado de una disminución o desregulación de las reservas fisiológicas de múltiples sistemas, lo cual origina dificultades para mantener la homeostasis” (Fried L.P. *et al.*, 2001). De esta manera, este término permite hacerse una idea del estado de salud del individuo, proporcionando una cuantificación más precisa de la vulnerabilidad que si sólo se atiende a la propia edad cronológica. Aquellos que son frágiles presentan un mayor riesgo de discapacidad, institucionalización y muerte (Fried L.P. *et al.*, 2001; Rockwood K. y Mitnitski A., 2007). De hecho, se ha descrito que la condición de fragilidad puede predecir mejor la mortalidad que la propia edad cronológica (Mitnitski A.B. *et al.*, 2002).

Por otro lado, Rockwood y colaboradores asocian el término fragilidad al equilibrio inestable de una balanza cuya dirección dependerá de los pesos positivos y negativos que sobre ella incidan (Rockwood K. *et al.*, 2000). De esta manera, consideran que cualquier definición de fragilidad debería considerar los siguientes factores: inestabilidad, cambio en el tiempo, deterioro multisistémico, asociación tanto con el incremento del riesgo de resultados adversos como con la edad y heterogeneidad en la población. Además, este autor propone que para que cualquier definición de fragilidad que pretenda ser universal pueda ser considerada como válida debe cumplir con el conjunto de características propuestas en la Tabla 1.1 (Rockwood K., 2005).

Validez de contenido	Incluye múltiples determinantes Es dinámica Su validez hace que pueda sustituir a definiciones previas Se puede emplear con éxito en diferentes contextos Puede ser empleada en programas computacionales
Validez de constructo	Es más común en mujeres que en hombres Es más común a edades avanzadas Se relaciona con la discapacidad Se relaciona con la comorbilidad y la autopercepción de salud
Validez de criterio	Predice la mortalidad Predice otros eventos adversos (delirium, caídas, disminución de la funcionalidad...) Predice una edad a la cual todo el mundo podría ser frágil Aplicable tanto en estudios básicos de laboratorio como en clínicos poblacionales.

Tabla 1.1. Criterios necesarios para una definición válida de fragilidad

Así, en el “*Canadian Study of Health and Aging*” (CSHA) propone el concepto de fragilidad como una acumulación de déficits (Rockwood K. *et al.*, 2005).

Otras definiciones propuestas son: “agrupación de problemas y pérdidas de capacidades que hacen al individuo más vulnerable a los retos ambientales” (Strawbridge W.J. *et al.*, 1998) o “sistema de salud especialmente vulnerable que se halla fragmentado y que falla en el mantenimiento y la restauración de una función” (Evans L.K. *et al.*, 1995). Todas estas aproximaciones parten de una misma idea: la fragilidad es una entidad multisistémica, distinta de la discapacidad, caracterizada por una serie de déficits, que aumentan la vulnerabilidad del individuo.

Por otro lado, en geriatría, el término “síndrome” se emplea comúnmente para indicar el conjunto de efectos producidos por deterioros en múltiples sistemas, los cuales resultan en determinadas manifestaciones adversas (Tinetti M.E. *et al.*, 1995; Flacker J.M., 2003). Por tanto, la fragilidad entendida desde el marco conceptual anteriormente propuesto, es considerada por numerosos autores, como un síndrome geriátrico (Mitnitski A.B. *et al.*, 2002; Ahmed N. *et al.*, 2007; Xue Q.L., 2011; Chen X. *et al.*, 2014).

Además, esta condición hace referencia a una situación dinámica, es decir, existe un continuo entre la no fragilidad o vigorosidad y la fragilidad, de tal manera que lo más probable es que cualquier anciano no permanezca igual de frágil o de vigoroso por largos periodos de tiempo, y por otra parte, no todos los ancianos son frágiles en la misma medida (Castelblanque E. y Albert Cuñat V., 2002). Además, se ha sugerido que este proceso es susceptible de acción activa y reversible (Bortz W.M., 2002).

El diagnóstico temprano de la fragilidad y el empleo adecuado de técnicas terapéuticas y rehabilitadoras pueden modificar positivamente la expresión esperada de la discapacidad en el anciano (Vellas B.J. *et al.*, 1997; Chen X. *et al.*, 2014), lo cual repercutiría positivamente en la calidad de vida de la persona mayor.

1.1.2.2. Prevalencia

Aunque por lo general se considera que la prevalencia de la fragilidad aumenta con la edad, con el sexo femenino y con la presencia de enfermedades crónicas, no existe un consenso general sobre la tasa de prevalencia de fragilidad (Fried L.P. *et al.*, 2001; Collard R.M. *et al.*, 2012; Shamliyan T. *et al.*, 2013). Una

posible explicación es la falta de consenso que acabamos de comentar en cuanto a la definición, así como a la variabilidad de criterios de diagnóstico empleados en los estudios clínicos.

Una revisión reciente sobre el tema muestra que la prevalencia de fragilidad puede variar desde el 4 al 59.1% entre 21 estudios clínicos (Collard R.M. *et al.*, 2012). Sin embargo, si sólo se tienen en cuenta aquellos en los que se han empleado los criterios de Fried, los cuales comentaremos posteriormente, el rango disminuye, pasando a ser del 4 al 17%. Estos autores sitúan la prevalencia media de fragilidad en el 10.7% y la de prefragilidad del 41.6%. De esta manera, uno de cada 10 individuos mayores de 65 años podría ser considerado como frágil.

Además, seleccionando aquellos estudios que emplean los criterios de Fried, la prevalencia de fragilidad por grupos de edades es (Shamliyan T. *et al.*, 2013):

- 65-70 años → 3-6%
- 70-80 años → 5-12%
- 80-85 años → 16%
- Más de 85 años → 26%

1.1.2.3. Comorbilidad, discapacidad y fragilidad

Es importante destacar que, aunque en ocasiones estos tres términos se solapan, no todas las personas mayores con discapacidad son frágiles y que no todos los ancianos frágiles presentan discapacidad o comorbilidad (Fried L.P. *et al.*, 2004).

Si atendemos a la definición de dichos términos podemos observar diferencias claras. Comorbilidad implica padecer varias enfermedades; discapacidad, según la OMS, es la “restricción o pérdida de la capacidad para realizar una actividad”, y fragilidad, por otro lado, supone el aumento de la vulnerabilidad y alteración de la homeostasis por una disminución de la reserva funcional. Fragilidad y comorbilidad serían, por tanto, predictoras de discapacidad y ésta, además, podría exacerbar la comorbilidad y la fragilidad (Abizanda P. *et al.*, 2005).

Esta distinción conceptual es importante, ya que sólo la correcta definición de estos términos permite una atención, una formación, una investigación y una especialización adecuadas. Además, fragilidad, discapacidad y comorbilidad requieren, cada una de ellas, cuidados específicos en los ancianos (Abizanda P. *et al.*, 2005).

Aunque parece existir cierto consenso en que la fragilidad es una entidad clínica que abarca otros síntomas además de la discapacidad, es importante entender que la discapacidad no es una consecuencia irremediable de la fragilidad, y que la presencia de discapacidad no determina necesariamente la aparición de la fragilidad si no existen otros factores clínicos sobreañadidos (malnutrición, debilidad muscular, deterioro cognitivo, edad muy avanzada, etc.) que conviertan al individuo que la presenta en una persona vulnerable para desarrollar episodios adversos (Batzán J.J., 2006).

La discapacidad es la consecuencia más grave e importante del síndrome de fragilidad (Abizanda P. *et al.*, 2005), y se manifestaría si fuera inestable y reflejara la disfunción de múltiples sistemas (Batzán J.J., 2006).

1.1.2.4. Bases fisiopatológicas de la fragilidad

El proceso de envejecimiento lleva consigo un deterioro progresivo de los diversos sistemas fisiológicos, con el consiguiente descenso en la capacidad homeostática del individuo (Harman D., 2001). Los complejos mecanismos que intervienen en dicho proceso vienen determinados por una combinación de factores ambientales, genéticos y epigenéticos, los cuales regulan la expresión genética diferencial en las células y podrían ser especialmente importantes durante el desarrollo de la fragilidad (Clegg A. *et al.*, 2013)

Estos cambios en múltiples sistemas que tienen lugar durante el envejecimiento son determinantes para el desarrollo de la fragilidad, sobre todo aquellos relativos al sistema nervioso central, neuromuscular, neuroendocrino e inmunológico (Walston J. *et al.*, 2006; Clegg A. *et al.*, 2013). La interacción y acumulación de dichos cambios durante el envejecimiento da lugar a una disminución de la función y de las reservas fisiológicas, pero con la fragilidad se acelera esta disminución y los mecanismos homeostáticos empiezan a fallar (Ferrucci L. *et al.*, 2002).

Se ha postulado la existencia de un umbral fisiológico clave, de tal manera que cuando la acumulación de daño supera dicho umbral, la fragilidad se hace evidente (Fried L.P. *et al.*, 2009). Además, la fragilidad también se ha asociado con una pérdida de las reservas fisiológicas en los sistemas respiratorio, cardiovascular y renal. (Clegg A. *et al.*, 2013)

Por otro lado, se ha propuesto el llamado “ciclo de la fragilidad” (Walston J. y Fried L.P., 1999), mostrado en la Figura 1.3. El comienzo de este ciclo fisiopatológico consistiría en la aparición con la edad de los efectos fisiológicos

producidos por la falta de ejercicio físico, nutrición inadecuada, medio ambiente no saludable, lesiones, enfermedades y exceso de medicamentos. La interacción de estos factores podría dar lugar a una malnutrición crónica, agravada por cambios relacionados con la edad, produciéndose así una pérdida de masa ósea y muscular, dando lugar al fenómeno conocido como sarcopenia. Ésta se caracteriza por una pérdida de masa muscular, tal y como veremos posteriormente y produce, junto con otros fenómenos característicos del envejecimiento, una exacerbación en la sensación de esfuerzo percibido ante un ejercicio de una determinada intensidad. A medida que aumenta el esfuerzo percibido por el individuo, es más probable que éste evite la realización de ejercicio físico. Así, comienza un círculo vicioso de declinar energético, en el cual las manifestaciones clínicas del síndrome de fragilidad se relacionan entre sí y se unifican.

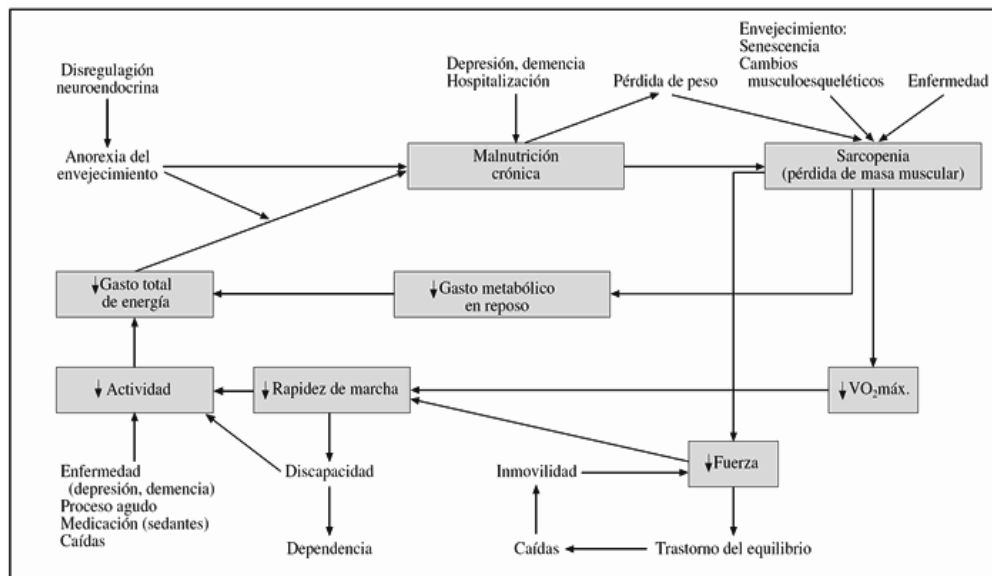


Figura 1.3. Ciclo de la fragilidad (traducido de Walston J. y Fried L.P., 1999)

1.1.2.5. Marcadores clínicos de fragilidad

Existen evidencias de que la fragilidad y, por ende, la discapacidad se pueden prevenir, tal y como veremos más adelante, a través de los cambios en los hábitos y estilos de vida. Para ello, es preciso delimitar los sujetos diana, para lo cual deberíamos, además de conocer las bases fisiológicas de la fragilidad que hemos comentado anteriormente, determinar posibles marcadores, tanto clínicos como bioquímicos, que ayuden a su identificación.

Fried y colaboradores publicaron los resultados del seguimiento durante 4 y 7 años de 5317 personas mayores americanas y afroamericanas con edades comprendidas entre los 65 y 101 años, formando así parte del “*Cardiovascular Health Study*” (CHS) (Fried L.P. *et al.*, 2001), validando así una definición de fragilidad, en base al ciclo anteriormente descrito. De este modo, definieron la fragilidad de acuerdo a la presencia de al menos 3 de los 5 criterios siguientes:

- Pérdida de peso no intencionada de más de 4.5 Kg en el último año.
- Sentimiento de agotamiento general, referido por el propio paciente, o baja resistencia a pequeños esfuerzos.
- Lentitud de la marcha (basados en una distancia de 4.6 m), ajustada por sexo y altura.
- Bajo nivel de actividad física, ajustado por sexo, en base al cálculo del consumo de calorías semanales.
- Disminución de la fuerza de prensión (medida con un dinamómetro), ajustada por sexo e índice de masa corporal (IMC).

Los individuos que cumplían 1 ó 2 de estos criterios eran considerados prefrágiles y los que no cumplían ninguno de ellos, no frágiles, robustos o

vigorous. Estos criterios son los más ampliamente utilizados, tanto en la práctica clínica como en la investigación. No obstante, según diversos autores, esta es una visión de la fragilidad muy centrada en el sistema músculo-esquelético y obvia las relaciones de estos cambios fisiopatológicos con la presencia de deterioro cognitivo, la otra gran fuente de discapacidad y de fragilidad (Ferrucci L. *et al.*, 2004; Buchman A.S. *et al.*, 2007; Boyle P.A. *et al.*, 2010; Clegg A. *et al.*, 2013).

Así, Rockwood y colaboradores proponen en el anteriormente citado CSHA, un índice de fragilidad en el que identifican 70 déficits, referentes a diferentes aspectos, entre los cuales se encuentran el estado cognitivo, funcional, nutricional, emocional y social (Rockwood K. *et al.*, 1999). En base a estos déficits, establecen 4 grados de discapacidad progresiva, incluidas las ABVD, la deambulación, las continencias y la cognición. Los mismos autores, sobre la base del mismo estudio, elaboraron posteriormente una escala de fragilidad clínica con 7 grados progresivos: 1) robusto; 2) bien, sin enfermedad; 3) bien, con enfermedad controlada; 4) vulnerable aparentemente; 5) leve dependencia en AIVD; 6) ayuda en las AIVD y en las ABVD, y 7) dependiente o terminal (Rockwood K. *et al.*, 2005). Estas escalas son predictoras de mortalidad y, desde el punto de vista clínico, podrían ser útiles dentro de una VGI para identificar sujetos con riesgo de eventos adversos. Sin embargo, incluyen medidas de discapacidad, lo cual las aleja del concepto de fragilidad como un estado “precursor” de discapacidad sobre el cual pueda actuarse para prevenirla (Abizanda P. *et al.*, 2010).

Recientemente, se ha propuesto una nueva escala de fragilidad denominada “rasgo de fragilidad” (García-García F. *et al.*, 2011; Garcia-Garcia F.J. *et al.*, 2014). Esta escala, basada en el constructo de Linda Fried, está compuesta por 12 ítems y evalúa 8 dimensiones de la fragilidad: balance energético, estado

nutritivo, pérdida de energía, actividad, fuerza, lentitud, sistema nervioso central y sistema vascular. Además, en ella se defiende que la sarcopenia, la arteriosclerosis y la disfunción ejecutiva comparten bases fisiopatológicas comunes, lo cual apoya la ampliación del espectro de la fragilidad a estas dos últimas dimensiones.

Desde la aproximación clínica, también se ha puesto de manifiesto la mayor probabilidad de fragilidad en mujeres (Walston J. y Fried L.P., 1999; Fried L.P. *et al.*, 2001). Estos autores sugieren que ser mujer podría conferir un riesgo intrínseco de fragilidad, debido a que parten de una menor masa y fuerza muscular que los hombres de su misma edad, por tanto, estarían más expuestas a la fragilidad. Además, se ha propuesto que las mujeres mayores tienen mayor probabilidad de tener unos ingresos menores comparados con los hombres, dado que viven, en su mayoría, solas (Evans L.K. *et al.*, 1995).

Desde una perspectiva funcional, tal y como hemos comentado anteriormente, numerosos autores han relacionado la fragilidad con la dificultad para la realización de las ABVD y para las AIVD. Mientras algunos consideran la dependencia en estas actividades como un buen marcador clínico de fragilidad, capaz de predecir la institucionalización, la necesidad de cuidados en el domicilio, y el riesgo de mortalidad, (Judge J.O. *et al.*, 1996; Rockwood K. *et al.*, 2005; Kiely D.K. *et al.*, 2009), la tendencia actual es a considerar que la fragilidad es un estado de pre-discapacidad, por lo que, tanto en su definición como en los instrumentos de medida, no deben aparecer determinantes de discapacidad (Whitson H.E. *et al.*, 2007; Abizanda P. *et al.*, 2010).

La fragilidad también se ha relacionado con la patología cardiovascular. La arterioesclerosis puede contribuir a la fragilidad mediante la disminución del riego

sanguíneo y la consiguiente oxigenación del músculo, pudiendo desencadenar en sarcopenia. Esto contribuye indirectamente al deterioro cognitivo y a una disminución de la actividad física, si se produce un derrame cerebral, insuficiencia cardíaca congestiva o infarto de miocardio (Hamerman D., 1999). Otros autores han confirmado posteriormente esta relación (Fried L.P. *et al.*, 2001; Afilalo J. *et al.*, 2009).

Por otro lado, la fragilidad también se ha relacionado con ser afroamericano, tener un menor nivel educativo o menores ingresos, padecer enfermedades crónicas, y con la discapacidad (Fried L.P. *et al.*, 2001; Hirsch C. *et al.*, 2006; Alvarado B.E. *et al.*, 2008; Samper-Ternent R. *et al.*, 2011).

1.1.2.6. Biomarcadores de fragilidad

La búsqueda de biomarcadores de fragilidad es un campo todavía por explorar, pero muy interesante si realmente se consiguiera encontrar en un futuro un marcador biológico (o varios) que fuera lo suficientemente sensible y específico como para identificar individuos frágiles que pudieran ser subsidiarios de intervenciones de prevención primaria (Butler *et al.*, 2004). Por esta razón, en los últimos años ha existido un intento de determinar biomarcadores específicos relacionados con los mecanismos moleculares implicados en el deterioro fisiológico característico de la fragilidad, que lleva consigo la aparición de los rasgos clínicos que hemos comentado anteriormente (ver Figura 1.4).

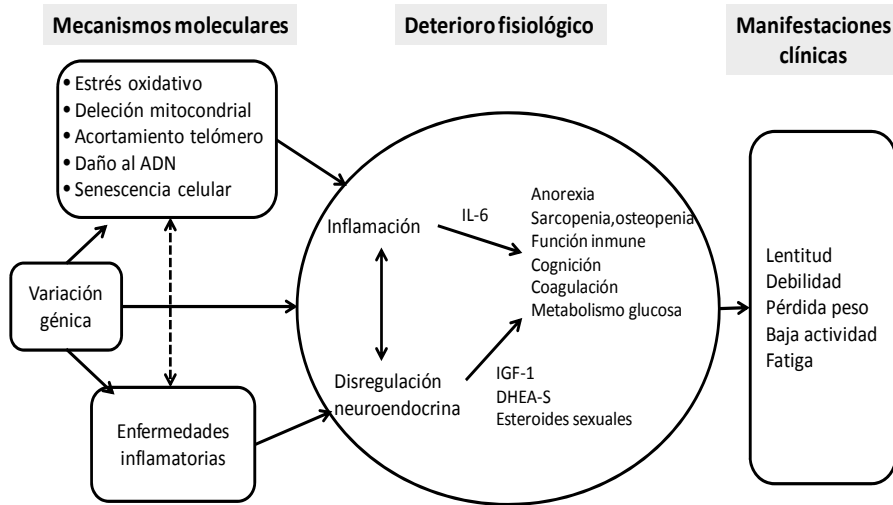


Figura 1.4. Patogénesis del síndrome de fragilidad (traducido de Walston et al. 2006)

Si atendemos a la definición de fragilidad, caracterizada por una disminución o pérdida de la homeostasis, podemos deducir que ésta se origina por la alteración de múltiples e interrelacionados sistemas.

En el “MacArthur Study of Successful Aging” se evidenció que la acumulación de biomarcadores empleados para evaluar la carga alostática de un sujeto tiene una relación dosis-efecto con la incidencia de fragilidad, por tanto podrían ser considerados como biomarcadores de ésta (Gruenewald T.L. et al., 2009).

En la Tabla 1.2 se muestran los biomarcadores de fragilidad propuestos hasta el momento, detallándose posteriormente cada uno de ellos.

Sistema neuroendocrino	Sistema inmune	Sistema cardiovascular	Sistema musculoesquelético	Metabolismo
↓ Testosterona	↑ PCR	↑ Factor VIII	Sarcopenia	↑ Glicemia
↓ DHEA	↑ IL-6	coagulación		↑ Obesidad abdominal
↓ GH-IGF 1	↑ TNF α	↑ Fibrinógeno		↑ Resistencia a la insulina
↑ Cortisol		↑ Dímero D		↓ Colesterol
		↑ α -1		↓ Albúmina
		Antitripsina		↓ Vitamina D

Tabla 1.2. Biomarcadores de fragilidad propuestos

1.1.2.6.1. Sistema neuroendocrino

El cerebro y el sistema endocrino están unidos intrínsecamente a través del eje hipotálamo-hipofisario, el cual, entre otras funciones, controla el metabolismo y el gasto energético a través de un mecanismo de señalización mediado por diferentes hormonas. Entre ellas, la fragilidad se ha relacionado con un descenso de la testosterona (Hyde Z. *et al.*, 2010), de la dehidroepiandrosterona (DHEA), pro-hormona precursora de andrógenos y estrógenos (Baylis D. *et al.*, 2012), del eje hormona de crecimiento- factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (GH-IGF 1) (Leng S.X. *et al.*, 2004), y por un aumento del cortisol (Holanda C.M. *et al.*, 2012).

1.1.2.6.2. Sistema inmune y cardiovascular

Se ha propuesto que el mecanismo de la inflamación juega un papel primordial en la fisiopatología de la fragilidad (Walston J. *et al.*, 2002; Hubbard R.E. y Woodhouse K.W., 2010). De hecho, se ha demostrado una relación positiva entre condición de fragilidad, marcadores de inflamación y activación de la

cascada de coagulación (Walston J. *et al.*, 2002). Estos autores observaron que existe un incremento significativo en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, como la proteína C reactiva (PCR), en pacientes frágiles en comparación con los no frágiles, después de excluir a los diabéticos y cardiopatas. También se han detectado mayores niveles de interleuquina 6 (IL-6) en pacientes frágiles, lo cual se ha asociado a una menor fuerza muscular y a una mayor lentitud en la marcha, ambos considerados como criterios de fragilidad (Ferrucci L. *et al.*, 2002; Puts M.T. *et al.*, 2005). Además, se ha constatado que niveles séricos elevados de IL-6, PCR e IL-1Ra se asocian significativamente con la disminución de la fuerza muscular y del rendimiento físico (Cesari M. *et al.*, 2004) y que niveles altos de TNF- α e IL-6 se relacionan de manera importante con fragilidad y enfermedad cardiovascular (De Martinis M. *et al.*, 2006). Con respecto a los marcadores de la vía de coagulación, se han asociado altos niveles de factor VIII de coagulación, fibrinógeno, dímero D y la α -1 antitripsina con el estado de fragilidad (Reuben D.B. *et al.*, 2000; Walston J. *et al.*, 2002).

1.1.2.6.3. Sistema músculo-esquelético

Bajo circunstancias normales, la homeostasis muscular se mantiene gracias a un delicado equilibrio entre la formación de nuevas células musculares, hipertrofia y pérdida proteica. Este equilibrio es coordinado por el cerebro, sistema endocrino e inmune y se ve afectado por factores nutricionales y la cantidad de ejercicio físico. Dado que con la fragilidad estos sistemas se encuentran alterados, dicho equilibrio se rompe, dando lugar al fenómeno conocido como sarcopenia.

La sarcopenia es considerada como el componente clave de la fragilidad (Roubenoff R., 2000), caracterizada por una pérdida de fuerza y masa muscular. La

fisiopatología de la sarcopenia supone una denervación de las unidades motoras, la conversión de fibras musculares rápidas (tipo II) en fibras lentas (tipo I) y el depósito de lípidos en el tejido muscular (Lang T. *et al.*, 2010). Uno de los mecanismos moleculares que se ha propuesto como implicado en la pérdida de masa muscular característica de la sarcopenia es la apoptosis (Leeuwenburgh C. *et al.*, 2005; Marzetti E. y Leeuwenburgh C., 2006). Así, se ha encontrado un aumento de marcadores de apoptosis de la vía intrínseca (Endo G) en sóleo de ratas viejas con atrofia inducida, en comparación con las jóvenes (Leeuwenburgh C. *et al.*, 2005).

Por otro lado, el Consenso Europeo sobre la definición y diagnóstico de la sarcopenia sugiere que el diagnóstico de sarcopenia puede establecerse midiendo los siguientes puntos (Cruz-Jentoft A.J. *et al.*, 2010):

- Masa muscular → Para la medición de la masa muscular, la absorptimetría de rayos X de energía Dual o DEXA (del inglés, *dual-energy x-ray absorptiometry*) es considerado el método estándar. Otros métodos para cuantificar la masa muscular incluyen la impedancia bioeléctrica, la tomografía axial computarizada, la resonancia magnética, la excreción urinaria de creatinina o mediciones antropométricas.
- Fuerza muscular → Para su determinación, se mide la fuerza de agarre mediante un dinamómetro, o se valora la flexo-extensión de rodilla. Niveles bajos de fuerza de agarre predicen mejor el riesgo de padecer complicaciones clínicas que niveles bajos de masa muscular (Lauretani F. *et al.*, 2003). Además, existe una clara relación lineal entre niveles bajos de fuerza de agarre y la incidencia de dificultades para la realización de las ABVD (Al Snih S. *et al.*, 2004). El mismo Consenso Europeo establece que

la medición de la fuerza de agarre es un método más simple y preciso que la complicada medición de la fuerza muscular de miembros inferiores.

- Rendimiento físico → Medido con el “*Short Physical Performance Battery*” (que incluye la prueba de caminar 8 pies), velocidad de la marcha normal, test de 6 minutos marcha, el test “*Timed Get Up and Go*” y el “*Stair Climb Power Test*”.

1.1.2.6.4. Sistema metabólico

Se han estudiado otros marcadores metabólicos como la insulina, la glicemia, los lípidos y las proteínas.

Con respecto a la glicemia y la insulina, los individuos frágiles no diabéticos muestran valores de glucosa significativamente superiores a los no frágiles, en ayunas y 2 horas después de la ingestión oral de 75g de glucosa (Walston J. *et al.*, 2002). Además, en estudios transversales y longitudinales (Woods N.F. *et al.*, 2005; Alvarado B.E. *et al.*, 2008; Hubbard R.E. *et al.*, 2010), se ha observado que la obesidad se asocia a fragilidad, especialmente a la obesidad abdominal (Hubbard R.E. *et al.*, 2010). Así mismo, una situación relacionada con la obesidad, la resistencia a la insulina, se considera como un determinante de sarcopenia y un factor de riesgo de fragilidad (Barzilay J.I. *et al.*, 2007).

Con respecto a los lípidos y proteínas, se ha postulado la relación entre la fragilidad y una disminución en los niveles de albúmina y colesterol total (Schalk B.W. *et al.*, 2004), así como niveles inferiores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Walston J. *et al.*, 2002). Estos y otros autores (Ranieri P. *et al.*, 1998) plantean que la disminución del riesgo de fragilidad está asociado al incremento

de los niveles de las LDL, de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la del colesterol total. En efecto, cuando se excluyen a los diabéticos y cardiópatas, aquellos con mayores niveles de colesterol total y de LDL, tienen menor probabilidad de ser frágiles. La disminución de los niveles séricos de colesterol, albúmina y HDL está asociada al aumento del riesgo relativo de muerte (Reuben D.B. *et al.*, 2000; Zuliani G. *et al.*, 2004).

Por otro lado, recientemente se ha relacionado la deficiencia de un micronutriente, la vitamina D, con la fragilidad (Wilhelm-Leen E.R. *et al.*, 2010), e incluso se ha propuesto que los individuos considerados como prefrágiles con niveles mayores de dicha vitamina, tienen más probabilidades de recuperarse y convertirse en no frágiles que aquellos con niveles inferiores (Shardell M. *et al.*, 2012).

Otros posibles biomarcadores relacionados con la fragilidad, y que son objeto de la presente tesis, son ciertos marcadores de estrés oxidativo, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), o los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphism*), los cuales vienen detallados más ampliamente en los siguientes apartados.

1.1.2.7. Estrategias de intervención

Existen evidencias de que la fragilidad y sus consecuencias son modificables, sobre todo si se actúa en estadios precoces. De esta manera, las intervenciones destinadas a tratar la fragilidad deben estar enfocadas a:

- Prevenir, retrasar, revertir o reducir la severidad de la fragilidad.

- Prevenir o reducir las consecuencias adversas para la salud de la fragilidad en aquellos casos en los que la fragilidad no puede revertirse (Chen X. *et al.*, 2014).

Hasta la fecha, el ejercicio físico es la única intervención que ha mostrado efectos beneficiosos sobre la fragilidad y sus componentes clave, es decir, el sistema musculoesquelético, endocrino e inmune. En este sentido, se ha observado cómo, una vez establecida la fragilidad, el riesgo de discapacidad se puede atenuar mediante programas de intervención que incluyen ejercicio físico y que el efecto es mayor cuando se actúa sobre estadios precoces de la fragilidad (Gill T.M. *et al.*, 2002). Tres revisiones sistemáticas sobre ejercicios individuales en el propio domicilio y ejercicios en grupo han corroborado estos resultados, observando cómo el ejercicio físico puede mejorar la movilidad y la capacidad funcional (Theou O. *et al.*, 2011; Clegg A. *et al.*, 2012; de Vries N.M. *et al.*, 2012). Además, es interesante señalar que la adherencia al ejercicio en dichos estudios fue alta.

Las intervenciones nutricionales deberían ser capaces de combatir los problemas de nutrición y de pérdida de peso asociados a la fragilidad. Sin embargo, las evidencias son escasas. De hecho, los suplementos nutricionales no se han mostrado eficaces para mejorar la fuerza muscular, velocidad de la marcha, la capacidad de subir escaleras o la actividad física (Fiatarone M.A. *et al.*, 1994).

La administración de diversos agentes farmacológicos, como la testosterona o inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECAs), tampoco ha mostrado efectos determinantes sobre la fragilidad (Clegg A. *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha visto que aquellos individuos que reciben una VGI, junto con un tratamiento multidisciplinar individualizado, tienen más probabilidades de volver a casa tras un ingreso, menos probabilidades de padecer deterioro cognitivo y funcional, y tienen menores índices de caídas, lesiones y de mortalidad durante un ingreso que aquellos que acuden a una visita médica general (Fairhall N. *et al.*, 2011; Clegg A. *et al.*, 2013)

1.1.3. ESTRÉS OXIDATIVO

El proceso de envejecimiento está asociado, entre otros, con inflamación, activación del “factor nuclear kappa B” (NFkB), descenso de la función inmunitaria (Baeza I. *et al.*, 2009), aumento de la apoptosis (Chung H. y *et al.*, 2002; Zhang Y. y Herman B., 2002), daño a las mitocondrias (Rodriguez M.I. *et al.*, 2007), aumento en la tasa de producción de radicales libres y descenso de defensas antioxidantes (Wickens A.P., 2001), con el consiguiente aumento del estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies H., 1985).

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas especies activadas de oxígeno, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes (Halliwell B., 1996).

La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable (Slater T.F., 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. En condiciones normales, estas especies tan reactivas no causan daño oxidativo debido a que la célula está

provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes. Además, se ha visto que los radicales libres, a dosis moderadas, juegan un papel muy importante en la regulación de procesos de señalización celular (Droge W., 2002)

Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por: un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o ambos factores a la vez (Sies H., 1983), pudiendo producir así un daño oxidativo a biomoléculas, principalmente lípidos, proteínas y ADN (Bokov A. *et al.*, 2004).

1.1.3.1. Radical libre

1.1.3.1.1. *Concepto*

Radical libre es aquella especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia, lo cual confiere a estas especies una gran reactividad (Fridovich I., 1978). Se caracterizan por su gran poder oxidante y porque su vida media es normalmente muy corta, aunque varía en función del radical libre (Simic M.G. y Taylor K.A., 1988).

Estas especies químicas abundan en los sistemas vivos. Es más, los radicales libres han sido propuestos como una de las causas del origen de la vida en nuestro planeta (Harman D., 2001).

Por tanto, vemos como el oxígeno tiene una “doble cara”: por una parte interviene en el origen a la vida y por otra, debido a su capacidad para formar distintos radicales libres, es capaz de dañar estructuras esenciales para el desarrollo de ésta, tales como el ADN, proteínas, glúcidos y lípidos (Sies H., 1983; Halliwell B. y Gutteridge J.M.C., 1985; Bokov A. *et al.*, 2004).

Además, los radicales libres intervienen en procesos fisiopatológicos, tales como el cáncer, la aterosclerosis, la diabetes, las enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias y en procesos fisiológicos como el envejecimiento y el ejercicio físico agotador (Davies K.J. *et al.*, 1982; Pacifici R.E. y Davies K.J., 1991; Sastre J. *et al.*, 1992; Durackova Z., 2010; Nogueira V. y Hay N., 2013).

En la naturaleza, los radicales libres son mayoritariamente compuestos derivados del oxígeno y se denominan especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas especies, o bien son muy reactivas, o son capaces de dar lugar a especies reactivas (ver Tabla 1.3). Algunas de ellas son auténticos radicales libres derivados del oxígeno, como el radical hidroxilo. Otras como el H_2O_2 , no son en realidad radicales en el sentido estricto de su definición. Además, existen otras especies radicalarias no derivadas del oxígeno que están tomando interés en los últimos años, como las derivadas del nitrógeno (RNS).

ESPECIE	SÍMBOLO
Radical superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$
Radical hidroperóxido	$\text{HO}_2\cdot$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	$\cdot\text{OH}$
Radical alcóxido	$\text{RO}\cdot$
Radical peróxido	$\text{ROO}\cdot$
Óxido nítrico	$\text{NO}\cdot$
Dióxido de nitrógeno	$\text{NO}_2\cdot$

Tabla 1.3. Especies activadas del oxígeno y nitrógeno

1.1.3.1.2. Génesis de radicales libres

Las especies reactivas de oxígeno pueden tener un origen exógeno o endógeno (Finkel T. y Holbrook N.J., 2000). Los radicales libres de origen exógeno son aquellos que provienen de fuentes externas al organismo, tales como la dieta (en la que son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante), xenobióticos, toxinas ambientales (humo del tabaco, contaminación ambiental), radiaciones ionizantes y luz ultravioleta.

Los radicales libres de origen endógeno son aquellos que se producen en el interior de la célula. Muchos procesos biológicos liberan ROS como productos de desecho, a través de una vía de señalización celular o como mecanismo de defensa (Morgan M.J. y Liu Z.G., 2011). Entre ellos destacan la reacción de Fenton-Haber-Weiss, la familia de las nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH oxidasas), los peroxisomas, citocromo p450, citoquinas, factores de crecimiento, lipooxigenasas, ciclooxigenasas y, sobre todo, la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en el interior de la célula (Finkel T. y Holbrook N.J., 2000; Balaban R.S. *et al.*, 2005) Está compuesta por una serie de proteínas con capacidad redox que reducen al oxígeno molecular hasta la formación de una molécula de agua. Esta reacción está acoplada a la fosforilación oxidativa, en la cual se produce energía en forma de adenosín trifosfato (ATP).

1.1.3.1.3. Mecanismos de protección frente a los radicales libres: antioxidantes fisiológicos

Dado que los seres vivos han evolucionado en presencia de sustancias oxidantes, han sido dotados de sistemas capaces de hacer frente a este tipo de sustancias tan reactivas. Halliwell en 1995 definió como antioxidante a “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Sies H., 1993; Halliwell B. y Gutteridge J.M., 1995). Pueden actuar de las siguientes formas:

- Previniendo la formación de ROS.
- Interceptando el ataque de ROS.
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS.
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS.
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Bajo el punto de vista de la fisiología celular, los podemos dividir en antioxidantes primarios, secundarios y terciarios.

Los **antioxidantes primarios** previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Estos antioxidantes actúan por conversión de los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Dentro de este grupo se incluye a la SOD, la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina)

que limitan la disponibilidad de hierro necesario para la formación del radical hidroxilo (Halliwell B.G., J.M.C., 1989).

Los **antioxidantes secundarios** son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay superproducción de los mismos y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye el glutatión, la vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Halliwell B. y Gutteridge J.M., 1990).

Los **antioxidantes terciarios** reparan biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos intracelulares, que actúan degradando proteínas dañadas oxidativamente, evitando de este modo su acumulación (Davies K.J. *et al.*, 1987; Pacifici R.E. y Davies K.J., 1991). También podemos destacar las enzimas reparadoras de ADN, la metionina sulfóxido reductasa y la fosfolipasa A2, que corta los fosfolípidos oxidados de la membrana (Sevanian A. *et al.*, 1985).

1.1.3.1.4. Papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento

En un estudio se observó que los niveles de diversos antioxidantes, tales como la vitamina E, el urato, la ceruloplasmina y la actividad SOD en diferentes organismos mostraban una correlación con la tasa metabólica multiplicada por la longevidad máxima de cada especie (Cutler R.G., 1984). Consecuentemente, se propuso que la duración de la vida se debería correlacionar con la capacidad de protección antioxidante. En esta línea, se crearon moscas *Drosophila melanogaster* doblemente transgénicas, que sobreexpresaban Cu, Zn-SOD y catalasa y se observó que la disminución del estrés oxidativo se correlacionaba con el aumento de la longevidad media y máxima de dichas moscas (Orr W.C. y

Sohal R.S., 1994). Además, se enlentecía el proceso de envejecimiento, ya que las moscas transgénicas presentaban un retraso en la pérdida de la capacidad física y niveles inferiores de daño oxidativo a proteínas.

Sin embargo, tal y como se ha comentado anteriormente, diversos estudios han generado controversia en cuanto al papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento. Así, se ha visto que la sobreexpresión de enzimas antioxidantes o la administración de sustancias antioxidantes no siempre prolonga la vida en ratones (Huang T.T. *et al.*, 2000; Perez V.I. *et al.*, 2009; Sadowska-Bartosz I. y Bartosz G., 2014) ni en humanos (Howes R.M., 2006; Bjelakovic G. *et al.*, 2007). En estos estudios, se ha visto como el suministro de sustancias antioxidantes no sólo no disminuye la incidencia de eventos adversos (como el cáncer o enfermedades cardiovasculares), sino que incluso puede producir efectos indeseados o aumentar el riesgo de mortalidad.

1.1.3.2. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas

1.1.3.2.1. *Daño oxidativo a lípidos*

De los principales tipos de biomoléculas, los lípidos y, sobre todo, los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres (Cheeseman K.H. y Slater T.F., 1993), siendo el radical hidroxilo (OH•), el peróxido (ROO•), el alcoxilo (RO•) y el alquílico (R•) los principales generadores de daño oxidativo a lípidos.

El proceso de ataque oxidativo a lípidos, denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Halliwell B., 1994; Krinsky N., 1994). Esta reacción se produce

preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados, con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell B., 1994).

De esta manera, un sólo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE), e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Freeman B.A. y Crapo J., 1982; Halliwell B., 1991; Cheeseman K.H. y Slater T.F., 1993; Halliwell B., 1994). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el ADN y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Krinsky N., 1994; Hohn A. *et al.*, 2013).

La peroxidación lipídica se considera un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas (Lippman R.D., 1985) y se relaciona con diversos estados patológicos, tales como la inflamación, la arterioesclerosis, las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (Gueraud F. *et al.*, 2010). Además, el daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor clave en la disminución de la fluidez de dichas membranas (Shigenaga M.K. *et al.*, 1994) y está relacionado con la longevidad de las especies (Jove M. *et al.*, 2013).

1.1.3.2.2. Daño oxidativo a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos de ser atacados por los radicales libres, especialmente por el radical hidroxilo (Stadman E.R., 1992). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el

Introducción

triptófano, la histidina, la metionina, la y la leucina son los que más procesos oxidativos sufren (Davies K.J. *et al.*, 1987; Hohn A. *et al.*, 2013).

En la Tabla 1.4 se resumen los sistemas fisiológicamente más importantes que producen la oxidación de proteínas.

ENZIMÁTICOS	NO ENZIMÁTICOS
NAD(P)H oxidasas/ NAD(P)H/ Fe(III)/ O ₂	Ascorbato/Fe(III)/O ₂
Xantina oxidasa/ Hipoxantina/ Fe(III)/ O ₂	RSH/Fe(III)/O ₂
Citocromo P450 reductasa/ Citocromo P450/ NADPH/ Fe(III)/ O ₂	Fe(II)/O ₂
Citocromo P450 Reductasa/ redoxina/ Citocromo P450/ NADH/ Fe(III)/ O ₂	Fe(II)/H ₂ O ₂ (reactivo de Fenton)
Nicotinato hidroxilasa/ NADPH/ Fe(III)/ O ₂	Ascorbato/Fe(III)/O ₂

Tabla 1.4. Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas.

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como la lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que la carbonilación de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadman E.R., 1992; Dalle-Donne I. *et al.*, 2003). Otros aminoácidos como la histidina, cisteína y metionina, presentan daño oxidativo, pero de manera indirecta, por los productos generados durante la peroxidación (MDA, HNE, entre otros), pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadman E.R., 1992).

Como consecuencia, la exposición proteica a los radicales libres puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína, produciendo así modificaciones en su estructura primaria, secundaria y, en última instancia, terciaria, lo cual, a su vez, puede dar lugar a una pérdida o modificación de su función biológica, que suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de dicha proteína

(Dean R.T. *et al.*, 1993). Además, si dichas proteínas disfuncionales no son degradadas, los residuos hidrofóbicos pueden formar agregados proteicos que, con el tiempo, se entrecruzan covalentemente, dando lugar al complejo proteico conocido como lipofuscina (Hohn A. *et al.*, 2013).

1.1.3.2.3. Daño oxidativo a glúcidos

Los glúcidos reaccionan con facilidad con el radical hidroxilo. Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini R. *et al.*, 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Borel J.P. *et al.*, 1988), dando lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico, cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes, sobre todo al radical superóxido, provoca su fragmentación, lo cual conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide (Greenwald, R.A. y Moy, W.W. 1980). Se ha observado que la SOD es capaz de proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico en el líquido sinovial (McCord J.M., 1974). Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar (Greenwald R.A. y Moy W.W., 1980).

1.1.3.2.4. Daño oxidativo al ADN

El ADN también es susceptible de daño oxidativo, pudiendo así encontrar diversos subproductos tras dicho ataque oxidativo. Entre ellos, la oxidación de la 2-desoxiguanosina a 8-hidroxi 2'-desoxiguanosina (8-OHdG) es una de las lesiones más frecuentes, la cual reviste gran importancia por su elevado efecto mutagénico, ya que durante la replicación producirá transversiones de purinas (Kasai, H. y Nishimura, S. 1984; Shibutani, S. *et al.* 1992).

El daño oxidativo asociado a las proteínas y al ADN no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras puede aumentar la acumulación de daño oxidativo en el ADN, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Halliwell, B. y Auroma, O.I. 1991; Breen, A.P. y Murphy, J.A. 1995). Por ello, las lesiones oxidativas en el ADN parecen estar implicadas, no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada. El ADN dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina (Viguie, C.A. *et al.* 1993). Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones se acumulan, por lo que el número de mutaciones aumenta con la edad (Viguie, C.A. *et al.* 1993).

El ADN mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el nuclear (Richter, C. *et al.* 1988), ya que presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del ADN (Donald, R. y Johns, M.D. 1995); el sistema de reparación es menos efectivo (Shen, C.C. *et al.* 1995; Suter,

M. y Richter, C. 1999) y, por último, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de especies reactivas del oxígeno (Giulivi, C. y Davies, K.J.A. 1993). Otro factor distintivo del ADN mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta usualmente a una zona de ADN codificante (Linnane, A.W. *et al.* 1989; Ames, B.N. *et al.* 1993) y su repercusión suele ser, por tanto, más importante.

1.1.3.3. Marcadores de estrés oxidativo

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Entre los marcadores o indicadores propuestos se encuentra el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH), como indicador del estado redox, de modo que un aumento en la concentración de glutatión oxidado produce una alteración de dicho estado redox celular (Sies H., 1986).

El estrés oxidativo modifica la actividad de las proteínas, provocando cambios en su función, y haciéndolas más susceptibles a la degradación (Stadtman E.R., 1992). La interacción directa ROS-proteína, en presencia de metales, produce derivados carbonilos altamente reactivos que resultan de la oxidación de las cadenas laterales de residuos de lisina, arginina, prolina y treonina, de la ruptura del enlace peptídico mediante la ruta de la α -amidación o de la oxidación de residuos de ácido glutámico (Stadtman, 2003). Estos grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) se pueden detectar mediante la técnica *Western blotting* (ver apartado de material y métodos de la presente tesis) y su cuantificación es el método más

empleado para determinar la oxidación proteica (Berlett B.S. y Stadtman E.R., 1997; Chevion M. *et al.*, 2000; Beal M.F., 2002; Dalle-Donne I. *et al.*, 2003).

Además, como indicadores de daño oxidativo a lípidos, el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2,3-nonenal son los más empleados, aunque también se pueden considerar los niveles de pentano y de etano. El MDA es uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos en las membranas biológicas, capaz de provocar una alteración estructural en las mismas que desemboca en una pérdida de fluidez y, por tanto, un aumento de su rigidez (Shigenaga M.K. *et al.*, 1994). Por ello, es un índice ampliamente utilizado para conocer el nivel de oxidación lipídica de las membranas celulares. Se han descrito varios métodos para la determinación de MDA (Bird R.P. y Draper H.H., 1984; Esterbauer H. *et al.*, 1991). La mayoría son poco específicos, ya que utilizan el ácido tiobarbitúrico como reactivo y éste reacciona con todos los aldehídos de la muestra. Estos métodos se han mejorado gracias a la separación, por cromatografía líquida de alta resolución, del aducto malondialdehído- ácido tiobarbitúrico de otras sustancias que puedan interferir en la determinación (Knight J.A. *et al.*, 1988).

1.1.3.4. Estrés oxidativo y fragilidad

Walston y colaboradores analizaron los mecanismos moleculares y celulares que podrían estar implicados en la patogenia de la fragilidad, con especial atención al estrés oxidativo, daño del ADN mitocondrial y acortamiento de telómeros (Walston J. *et al.*, 2006). Estos autores sugirieron que el estrés oxidativo jugaba un papel fundamental en el deterioro multisistémico asociado a la fragilidad, que podía afectar a la expresión genética y, en última instancia, producir un daño a lípidos y proteínas. Así mismo, postularon que el estrés

oxidativo podía contribuir a la fragilidad activando el factor de transcripción NFκB, el cual se trasloca al núcleo de la célula, donde activa la transcripción de diversos genes, especialmente de tipo inflamatorio (Yamamoto Y. y Gaynor R.B., 2001), por ejemplo, citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-6 y TNFα (Taylor B.S. *et al.*, 1998; Ershler W.B., 2007). La inflamación sistémica, a su vez, contribuye al desarrollo de la fragilidad (Hubbard R.E. y Woodhouse K.W., 2010).

En este sentido, en un estudio con 619 mujeres mayores de 65 años, se observó que aquellas mujeres que presentaban menores niveles de antioxidantes tenían mayores niveles de IL-6 y que eran más vulnerables a la discapacidad y a la muerte en un período de 5 años (Walston J. *et al.*, 2006).

Además, el estrés oxidativo contribuye a diversos trastornos metabólicos sistémicos y a la inflamación asociados con la obesidad visceral (Furukawa S. *et al.*, 2004), la cual juega un papel importante en la fragilidad (Powers S.K. *et al.*, 2007). Por otro lado, contribuye a la pérdida de masa y función muscular tras la inactividad, es decir, a la sarcopenia, considerada a su vez como indicadora principal de fragilidad (Ershler W.B., 2007; Powers S.K. *et al.*, 2007), tal y como muestra la Figura 1.5.

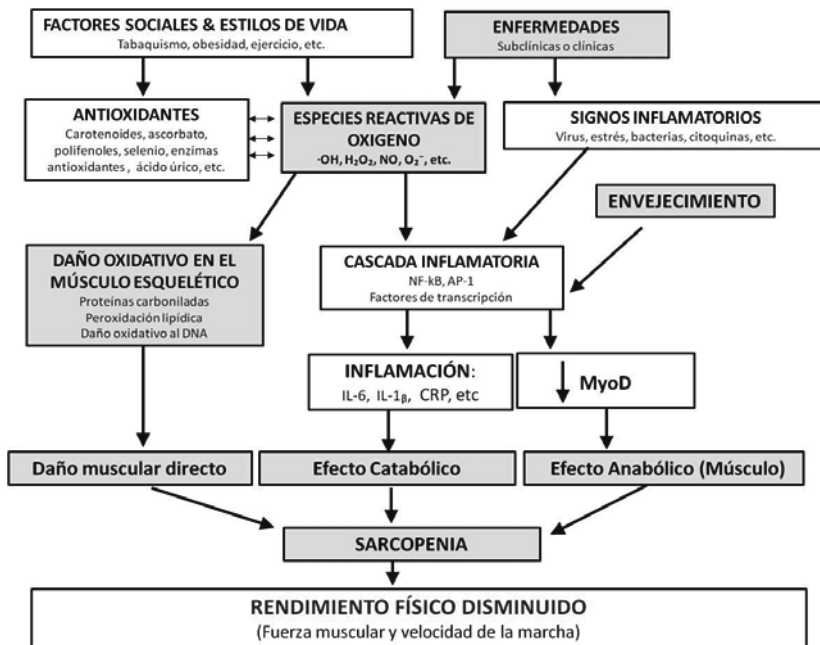


Figura 1.5. Mecanismos moleculares implicados en la sarcopenia (traducido de Ershler, W.B. 2007)

Por otro lado, se ha relacionado el daño oxidativo a proteínas (mediante la determinación de los niveles de carbonilación proteica) con una disminución de la fuerza de agarre (Howard C. *et al.*, 2007). El incremento en los niveles de proteínas oxidadas se ha mostrado como predictor de la aparición de dificultades para la marcha en un período de 3 años (Semba R.D. *et al.*, 2007) y ha sido propuesto recientemente como el mejor biomarcador de dependencia severa en las ABVD (evaluadas con el índice de Barthel) de entre 11 biomarcadores de estrés oxidativo (de Gonzalo-Calvo D. *et al.*, 2012).

Sin embargo, aunque acabamos de ver que diversos autores han propuesto el estrés oxidativo como mecanismo molecular subyacente a la condición de fragilidad, basándose en relaciones indirectas entre estrés oxidativo

y marcadores de fragilidad (inflamación, sarcopenia, obesidad...), hasta el momento sólo dos estudios han determinado la relación entre estrés oxidativo y fragilidad midiendo marcadores de daño oxidativo en individuos clasificados como frágiles, prefrágiles y no frágiles, según los criterios de Fried (Fried L.P. *et al.*, 2001).

En el primero, se estudiaron los niveles séricos de 8-OHdG, (considerado como el principal marcador de daño oxidativo a ADN) en 90 sujetos mayores de 65 años (13 no frágiles, 56 prefrágiles y 21 frágiles), encontrando mayores niveles de dicho marcador en los individuos frágiles (Wu I.C. *et al.*, 2009). La fragilidad en este estudio se correlacionó negativamente con los niveles séricos de albúmina y de forma positiva con los niveles de PCR y el ratio cintura-cadera, lo cual sugiere que el catabolismo de proteínas, la inflamación sistémica y la obesidad visceral relacionan el estrés oxidativo con la fragilidad.

Por otro lado, en un estudio con 62 pacientes ancianos, se demostró que el daño oxidativo al citosol, mediante el ratio GSSG/GSH, y el daño oxidativo a lípidos, mediante los niveles de MDA y HNE en plasma, se relacionaban con la fragilidad (Serviddio G. *et al.*, 2009).

1.1.4. FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF)

1.1.4.1. Concepto

Los factores neurotróficos son una importante familia de polipéptidos que modulan el crecimiento, la diferenciación, la reparación y la supervivencia neuronal (Reichardt L.F., 2006). Algunos tienen otras funciones, como la

colaboración en la neurotransmisión y en la reorganización sináptica que tiene lugar en el aprendizaje y la memoria (Yamada K. y Nabeshima T., 2003). La familia de factores neurotróficos más conocida es la de las neurotrofinas, compuesta por el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT 4/5) (Korsching S., 1993); de las cuales, las más estudiadas son el NGF y el BDNF. Las neurotrofinas se sintetizan inicialmente como pro-neurotrofinas, que son posteriormente escindidas a sus formas maduras y se unen a dos tipos de receptor: receptores tirosín-quinasa de alta afinidad (TrkA, TrkB y TrkC) y el receptor de baja afinidad p75. En concreto, el BDNF tiene mayor afinidad por el receptor TrkB y el p75 (Reichardt L.F., 2006).

El BDNF estimula el desarrollo y la diferenciación de nuevas neuronas (Alderson R.F. *et al.*, 1990), la supervivencia de las ya existentes (Hofer M.M. y Barde Y.A., 1988), la sinapsis y la plasticidad neuronal (Lo D.C., 1995), promoviendo la potenciación a largo plazo (Korte M. *et al.*, 1995). Se ha estudiado su expresión en diferentes áreas del cerebro, tales como el hipotálamo, hipocampo o amígdala, así como en el músculo esquelético, en el hígado, en el tejido adiposo, en el plasma y en el suero sanguíneo (Conner J.M. *et al.*, 1997; Lommatzsch M. *et al.*, 2005; Noble E.E. *et al.*, 2011).

Se ha postulado que el BDNF juega un papel crucial en diferentes aspectos de la cognición, tales como el aprendizaje, la memoria y el comportamiento. Así, un estudio ha constatado la presencia de niveles inferiores de BDNF en aquellos sujetos con enfermedad de Alzheimer y demencia vascular que puntuaron más bajo en la escala MMSE (Laske C. *et al.*, 2006). Además, su producción y secreción se ve alterada en diversas patologías neurodegenerativas, tales como el Alzheimer y el Parkinson, donde sus niveles se encuentran disminuidos (Connor B. *et al.*,

1997; Howells D.W. *et al.*, 2000). También se ha estudiado que los niveles de BDNF en suero son menores en los pacientes con trastorno depresivo o epilepsia (Bocchio-Chiavetto L. *et al.*, 2010; LaFrance W.C., Jr. *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha documentado un aumento de los niveles de BDNF en procesos inflamatorios inducidos, tanto *in vivo*, mediante la inyección de citoquinas pro-inflamatorias en ratas, como *in vitro*, mediante la inyección de las mismas citoquinas en cultivos celulares (Lin Y.T. *et al.*, 2011), y en enfermedades inflamatorias, como la encefalitis o la esclerosis múltiple. En estas enfermedades, se ha visto que las células T, B y monocitos secretan BDNF, lo cual sugiere la existencia de una reacción neuroprotectora colateral a la inflamatoria, con el objetivo de proteger a las neuronas de dicho daño inflamatorio (Kerschensteiner M. *et al.*, 1999; Stadelmann C. *et al.*, 2002).

La primera evidencia de la existencia de BDNF en suero y plasma sanguíneo se produjo en 1995 (Rosenfeld R.D. *et al.*, 1995). Recientemente se ha demostrado que los niveles de BDNF, tanto en plasma como en suero, reflejan los niveles en cerebro, ya que el BDNF puede atravesar la barrera hematoencefálica, liberándose al plasma y pudiendo volver del mismo modo al cerebro, existiendo así un flujo bidireccional (Klein A.B. *et al.*, 2011).

El BDNF circulante proviene tanto del cerebro como de los tejidos periféricos no neuronales, aunque se considera que durante el ejercicio el 75% de dicho BDNF circulante proviene del cerebro (Rasmussen P. *et al.*, 2009). El tejido músculo-esquelético, tal y como hemos comentado con anterioridad, puede sintetizar BDNF, pero éste no es liberado al torrente sanguíneo y, por tanto, no puede ser determinado en suero o plasma (Matthews V.B. *et al.*, 2009).

Diferentes estudios han relacionado el BDNF con el metabolismo de los glúcidos y de los lípidos, de tal manera que disminuye los niveles de glucosa, ácidos grasos y colesterol en sangre (Nakagawa T. *et al.*, 2002; Tsuchida A. *et al.*, 2002). Además, aumenta el metabolismo basal, provoca una pérdida de apetito y promueve la pérdida de peso (Noble E.E. *et al.*, 2011).

Por otro lado, en los últimos años, existen evidencias en animales y en humanos que muestran que el BDNF aumenta con el ejercicio, siendo esta elevación transitoria en el caso de ejercicio agudo y mantenida en sujetos entrenados por lo que, a corto plazo, el BDNF podría explicar parte de los beneficios de la actividad física sobre la cognición (Zoladz J.A. y Pilc A., 2010).

1.1.4.2. BDNF y estrés oxidativo

Diversos autores han estudiado la relación entre BDNF y estrés oxidativo, argumentando que esta neurotrofina es capaz de proteger frente al estrés oxidativo impidiendo la acumulación de radicales libres e incrementando las enzimas antioxidantes. De este modo, se ha visto cómo es capaz de proteger frente a la acumulación de H₂O₂ en neuronas de hipocampo, a la vez que incrementa los niveles de antioxidantes (Mattson M.P. *et al.*, 1995), y que la administración oral de vitamina E (en ratas sometidas a una dieta rica en grasas saturadas, asociada a una mayor producción de radicales libres), es capaz de aumentar los niveles de BDNF descendidos a causa de dicha dieta, lo cual indica que los niveles de BDNF podrían estar disminuidos en situaciones en las que exista un estrés oxidativo (Wu A. *et al.*, 2004). Otros estudios han confirmado esta hipótesis en humanos con trastorno afectivo (Kapczinski F. *et al.*, 2008). En la misma línea, se observó que una dieta rica en grasas saturadas aumentaba los niveles de MDA y disminuía los de BDNF en hipocampo, y que la inhibición de la

neurogénesis inducida por el MDA podía ser revertida por el BDNF (Park H.R. *et al.*, 2010).

Por otro lado, tal y como hemos comentado anteriormente, en ciertas patologías como el Alzheimer, los niveles de BDNF son bajos, lo cual contribuye a la neurodegeneración característica de esta enfermedad, que se acompaña de un aumento del estrés oxidativo (Keller J.N. *et al.*, 2005).

1.1.4.3. BDNF y fragilidad

Hasta el momento sólo un estudio ha relacionado los niveles de BDNF con la fragilidad (Coelho F.M. *et al.*, 2011). En este estudio se analizaron los niveles de BDNF en plasma, mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), de 48 mujeres clasificadas como no frágiles y prefrágiles, según los criterios de Fried. Estos autores encontraron niveles de BDNF en plasma significativamente superiores en las mujeres no frágiles, comparadas con las prefrágiles y, tras someter a 20 de esas 48 mujeres a un protocolo de ejercicio físico, dichas mujeres aumentaron los niveles de BDNF en plasma, con respecto al grupo control.

Además, la inactividad física relacionada con niveles bajos de BDNF se considera como precursor de la fragilidad, y se asocia a una pobre masa muscular, al tiempo que puede predecir la limitación funcional del individuo (García-García F. *et al.*, 2011).

1.1.5. VARIACIONES GÉNICAS: POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPs) Y VARIANTES RARAS

1.1.5.1. Marco teórico

El ADN es una molécula formada por dos largas cadenas de nucleótidos (cadenas o hebras de ADN), que permanecen unidas entre sí mediante enlaces conocidos como puentes de hidrógeno que se forman entre las bases de los nucleótidos y que adquieren una estructura tridimensional conocida como doble hélice (ver Figura 1.6). Los nucleótidos están formados por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada. En el caso de los nucleótidos del ADN, el azúcar es la desoxirribosa, y la base nitrogenada puede ser púrica (adenina [A] y guanina [G]) o pirimidínica (citosina [C] y timina [T]). El apareamiento entre dichas bases se produce siempre de la misma manera: [A] siempre se aparea con [T] y [G] siempre con [C] (Alberts B. *et al.*, 2010).

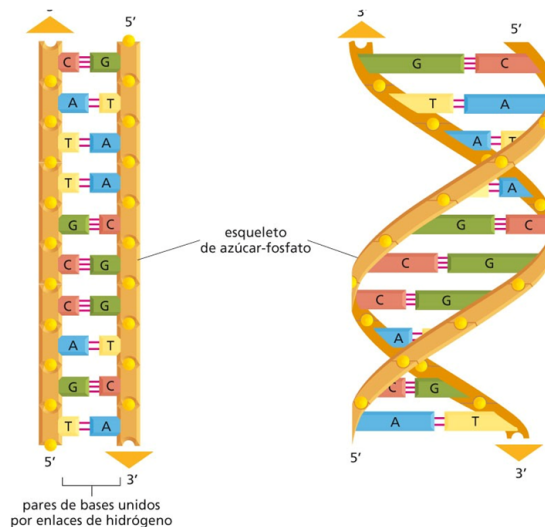


Figura 1.6. Estructura en doble hélice del ADN (Alberts B. *et al.*, 2010)

La función más importante del ADN es la de albergar la información necesaria para la creación y mantenimiento de un organismo vivo. Al conjunto completo de la información almacenada en el ADN de un organismo se le denomina genoma. El genoma humano contiene alrededor de 40000 genes distribuidos en 22 pares de cromosomas autosómicos y 2 cromosomas sexuales, contenidos en el interior del núcleo, aunque una pequeña parte del genoma humano se encuentra en la mitocondria (Alberts B. *et al.*, 2010).

Las células humanas somáticas contienen dos copias de cada cromosoma, una heredada del padre y otra de la madre, que no necesariamente deben contener la misma información para cada gen. A cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen se le denomina alelo. Cada par de alelos se ubica el mismo *locus* o lugar del cromosoma (Alberts B. *et al.*, 2010).

El proceso de síntesis de proteínas requiere que el ADN se transcriba a ácido ribonucleico (ARN), el cual, a su vez, se traducirá a proteínas, mediante la codificación específica de aminoácidos por parte de sus codones. Un codón es una estructura formada por tres nucleótidos contiguos de la secuencia de ARN mensajero que codifica a un aminoácido concreto.

Un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) o variante común es un cambio de nucleótido en la secuencia del ADN entre genomas de individuos de una misma especie, tal y como muestra la Figura 1.7. Para que se considere como SNP, dicho cambio debe tener una frecuencia del alelo menor (MAF, del inglés *minor allele frequency*) mayor al 1-5% según autores, es decir, debe estar presente en más del 1-5% de la población. En el caso de que la MAF sea menor del 1-5%, hablamos de variantes raras (Brookes A.J., 1999; Bustamante C.D. *et al.*, 2011; Gibson G., 2011).

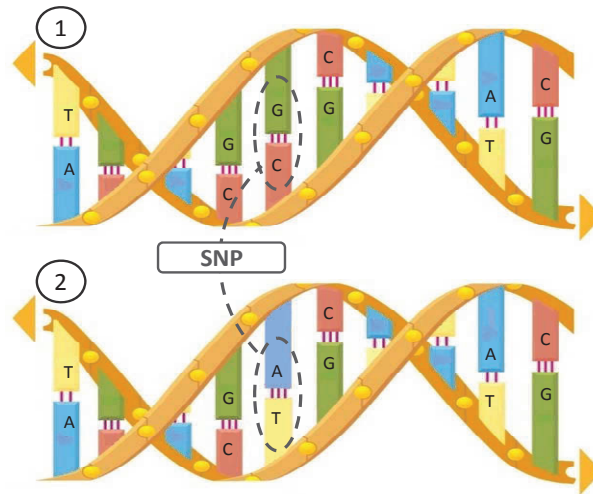


Figura 1.7. Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)

Hasta la fecha, se han descrito más de 10 millones de SNPs en el genoma humano, y su frecuencia se estima en 1 SNP por cada 300 bases. Además, los SNPs constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genéticas humanas (Brookes A.J., 1999; *The International HapMap Consortium*, 2003). Dado su elevado número, el sistema de nomenclatura más común es la asignación de un número con el prefijo “rs” (del inglés, *reference SNP*), por ejemplo, rs805086.

Los SNPs pueden localizarse bien en regiones codificantes del genoma, es decir, regiones exónicas, pudiendo alterar la estructura de la proteína y, por tanto, su función; o bien en regiones intrónicas no codificantes, las cuales están conservadas a través de las especies y pueden representar regiones reguladoras funcionalmente importantes. Dentro de estas regiones intrónicas se encuentran las UTR (del inglés, *untranslated region*), de tal manera que los SNPs localizados en ellas tampoco codifican a proteínas (Sauna Z.E. y Kimchi-Sarfaty C., 2011). A su vez, los SNPs localizados en regiones exónicas codificantes pueden suponer o no

un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína codificada, denominándose SNPs no sinónimos o sinónimos, respectivamente. En la Figura 1.8 se esquematiza esta clasificación, mostrándose un ejemplo de SNP sinónimo, en el que el cambio de la base G por C produce un cambio de codón a nivel de ARN mensajero, pero dicho codón codifica al mismo aminoácido. Así mismo, se muestra un ejemplo de un SNP no sinónimo en el que el cambio de la base T por G sí que produce un cambio del aminoácido codificado.

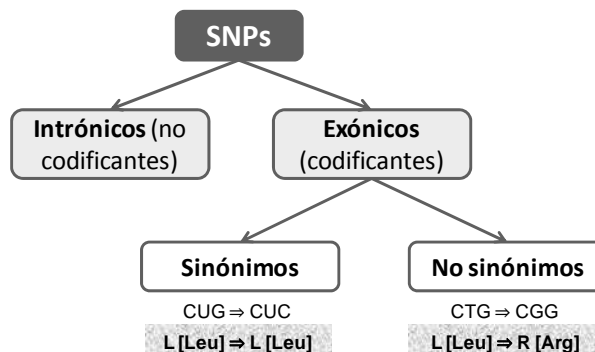


Figura 1.8. Tipos d SNP según su localización

1.1.5.2. Relevancia biológica

La relevancia clínica de las variantes genéticas, sobre todo aquellas localizadas en regiones codificantes del genoma, radica no sólo en que ayudan a la valoración del riesgo de padecer una determinada enfermedad, sino que también pueden predecir su evolución, especialmente en respuesta a un determinado tratamiento. De hecho, la presencia de variaciones genéticas puede contribuir a desencadenar respuestas alteradas ante determinadas intervenciones terapéuticas, pudiendo frenar la eficacia del tratamiento (MacAuley A. y Ladiges W.C., 2005).

Las variantes de baja frecuencia o variantes raras (definidas por una MAF<5%), que constituyen alrededor de un tercio de todos los polimorfismos genéticos (Gibson G., 2011), también contribuyen significativamente a la genética de la enfermedad (Abecasis G.R. *et al.*, 2010).

La aplicación clínica más probable a corto plazo de esta información genética es la mejora de la estratificación de riesgo, permitiendo a los individuos disponer de información acerca de su riesgo de enfermedad o pronóstico (Garatachea N. y Lucia A., 2013).

1.1.5.3. Estudios de asociación del genoma completo (GWAS)

Las características observables (fenotipo) de una enfermedad es resultado de la interacción entre el genotipo y múltiples factores ambientales (Brookes A.J., 1999; *The International HapMap Consortium*, 2003).

En enero de 2008, el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH, del inglés *National Institute of Health*) implementó una política para el intercambio de información obtenida en los llamados estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *Genome-wide association study*). El propósito de esta política fue fomentar el beneficio público de la ciencia a través de la creación de un repositorio centralizado de datos de SNPs, el NIH-GWAS (Welter D. *et al.*, 2014). El intercambio de dicha información génica permitiría a la ciencia médica entender mejor las necesidades de salud de la población y facilitar el desarrollo de nuevas tecnologías y enfoques para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades (McCarthy M.I. *et al.*, 2008).

El objetivo de los estudios de asociación genética es establecer la relación estadística entre un fenotipo determinado (riesgo de enfermedad, respuesta a un

determinado tratamiento, etc.) y variables genéticas poblacionales, las cuales están codificadas en los haplotipos de cada individuo (McCarthy M.I. *et al.*, 2008). Los haplotipos son una combinación de alelos localizados en diferentes locus en un mismo cromosoma que son heredados en conjunto y que ofrecen un marco natural para la realización de análisis conjuntos de múltiples marcadores (*The International HapMap Consortium*, 2003). Nuevos haplotipos se forman por mutaciones adicionales o por recombinación, cuando los cromosomas paternos y maternos intercambian segmentos correspondientes de DNA, resultando en un cromosoma que constituye un mosaico de los dos haplotipos parentales (Paabo S., 2003). Los haplotipos de varios SNPs, son las variables explicativas para las cuales se busca asociación con la variable respuesta (desenlace de una enfermedad), en un grupo de personas enfermas y sus controles, en la mayoría de los GWAS. Así, a través de regresión logística o pruebas Chi cuadrado (χ^2) se identifican SNPs asociados a la variable desenlace de la enfermedad (Balding D.J., 2006).

Para este fin, se utiliza normalmente como referencia la información obtenida del consorcio internacional HapMap (*The International HapMap Consortium*, 2003), o consorcios privados como el Proyecto de 1000 genomas (Abecasis G.R. *et al.*, 2010), cuyo objetivo es poner a disposición del usuario una base de datos que proporcione patrones comunes en la variación de la secuencia del DNA.

De esta manera, los estudios GWAS han cobrado gran importancia en los últimos años, ya que podrían ayudar a la identificación de sectores del genoma que describan la evolución y posible tratamiento de enfermedades (Suh Y. y Vijg J., 2005).

El primer estudio de asociación del genoma completo se publicó en 2005 (Klein R.J. *et al.*, 2005). En él se describía cómo aquellos individuos portadores de haplotipos particulares del SNP rs380390 presentaban un mayor riesgo de desarrollar degeneración macular asociada a la edad. Desde entonces, se han publicado 1751 estudios de este tipo, en los cuales se ha descrito la relación entre 11912 SNPs y la presencia de rasgos característicos de diversas enfermedades (Welter D. *et al.*, 2014).

Desde sus inicios, los estudios GWAS sacaron a la luz relaciones claras entre variantes comunes (SNPs) y muchas enfermedades comunes. Sin embargo, dependiendo de la condición en cuestión, dichas variantes explicaban sólo entre el 5 y el 50% de la heredabilidad de la enfermedad, de tal manera que muchos de los factores genéticos que podrían estar implicados seguían siendo una incógnita. Esto sugirió que las variantes raras debían tener una gran importancia, no sólo para determinar el riesgo de una persona de padecer una determinada enfermedad, sino también para predecir su respuesta a un determinado fármaco (Bustamante C.D. *et al.*, 2011). Desde entonces, el componente genético se ha atribuido a tres causas posibles: un gran número de variantes comunes de pequeño efecto a lo largo del espectro de frecuencias alélicas, un gran número de variantes raras de gran efecto, o la combinación de interacciones genotípicas, ambientales y epigenéticas (Gibson G., 2011). El interés, por tanto, ha pasado de estar centrado en el efecto de las variantes comunes en enfermedades comunes, a focalizarse en el efecto de las variantes raras y comunes en enfermedades complejas.

Una tendencia conciliadora sobre los efectos de las variantes raras y comunes considera que estas últimas influyen en la expresión y actividad de los genes en las vías de señalización, estableciendo el entorno responsable de la

enfermedad, el cual puede ser posteriormente modificado por las variantes raras, pudiendo desencadenar la misma o incluso producir mayores efectos (Gibson G., 2011).

Por otro lado, en base a estudios empíricos, se ha estimado que la mayor parte de la información relativa a la variación genética representada por los 10 millones de SNPs en la población mundial se podría conseguir genotipando de 200000 a 1000000 de SNPs del genoma (*The International HapMap Consortium*, 2003). Es importante destacar que en la mayoría de ensayos de genotipado, coexisten variantes comunes y raras (Brookes A.J., 1999).

1.1.5.4. Estudios GWAS sobre fragilidad

La influencia genética sobre la condición de fragilidad fue documentada en un estudio con 3719 personas mayores de 75 años, en el cual se observó que la variabilidad interindividual en el desarrollo del síndrome de fragilidad tenía un componente genético, con diferencias considerables en función del sexo: en los hombres, el estado de fragilidad dependía más de dichos factores genéticos, mientras que en las mujeres dependía más de factores ambientales. Además, se pudo observar cómo la influencia del componente genético es mayor a edades avanzadas (Dato S. *et al.*, 2012).

Hasta la fecha, los estudios de asociación génica en fragilidad se han dividido en dos grupos: aquellos que estudian la relación entre presencia de polimorfismos genéticos y la fragilidad, propiamente dicha, y aquellos que estudian la relación entre polimorfismos y las manifestaciones clínicas de la fragilidad.

1.1.5.4.1. Variación génica y fragilidad

En un estudio con 349 mujeres de edad avanzada, se genotiparon 1354 SNPs a lo largo de 134 genes relacionados fundamentalmente con la inflamación y el mantenimiento muscular, aunque secundariamente se incluyeron genes relacionados con la regulación de la apoptosis, biosíntesis y regulación transcripcional (Ho Y. y. *et al.*, 2011). Aunque ningún SNP fue estadísticamente significativo, los más asociados a la fragilidad fueron aquellos localizados en los siguientes genes: 5-Metiltetrahidrofolato-Homocisteína S-Metiltransferasa (MTR), Caspasa 8 (CASP8), Proteína de unión a CREB (CREBBP), Lisina acetiltransferasa 2B (KAT2B), y la proteína con repetición de beta-transducina (BTRC). Es interesante constatar como ninguno de los SNPs en genes relacionados con inflamación ni mantenimiento muscular elegidos inicialmente para el estudio fueron los más asociados a la fragilidad, sino que todos se localizaron en genes relacionados con la regulación de la apoptosis, biosíntesis y regulación transcripcional.

En cuanto al metabolismo de la Vitamina D, se han encontrado polimorfismos en el gen Transcobalamina-II (TCN2) relacionados estadísticamente con la fragilidad, tras ajustar por edad, presencia de enfermedades cardiovasculares y niveles séricos elevados de ácido metilmalónico (MMA) (niveles elevados de este marcador se han relacionado con la deficiencia de Vitamina D) (Matteini A.M. *et al.*, 2010). Empleando el MMA como un marcador de Vitamina B12, estos resultados sugieren que variantes en el gen TCN2 podrían dar lugar a una disminución de la disponibilidad de vitamina B12, provocando una disminución del metabolismo energético, lo cual contribuiría, en última instancia, a la aparición de la fragilidad.

Por otro lado, se ha estudiado la influencia de la función mitocondrial sobre el deterioro funcional y el aumento de la vulnerabilidad ante la enfermedad, ambos característicos de la fragilidad (Moore A.Z. *et al.*, 2010). De esta manera, se ha identificado un SNP en el ADN mitocondrial, el mt204, que se asocia significativamente a la fragilidad, independientemente de las enfermedades crónicas. Además, este SNP se relacionó con una disminución en la fuerza de agarre.

Tal y como hemos visto anteriormente, los niveles de PCR e IL-6 se encuentran aumentados en la fragilidad, lo cual contribuye a afianzar la hipótesis de que la inflamación es uno de los mecanismos claves en el desarrollo de la misma. De hecho, al estudiar si los niveles séricos de PCR y los polimorfismos en el gen correspondiente estaban relacionados con la fragilidad, se pudo observar cómo la concentración sérica de PCR fue mayor en individuos frágiles que en no frágiles, y que la presencia del polimorfismo CRP1846G>A aumentó la probabilidad de fragilidad, lo cual se asoció a una inadecuada respuesta de la PCR ante un determinado estrés (Almeida O.P. *et al.*, 2012). Sin embargo, al genotipar 14 SNPs en el gen IL-6 en 729 mujeres pertenecientes a dos cohortes poblacionales, no se produjo relación estadísticamente relevante entre ningún SNP de IL-6 y los niveles séricos de IL-6, la fuerza de agarre, de rodilla o de cadera, o la fragilidad (Walston J. *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren la posible existencia de factores ajenos a la variación génica que deben tener un papel más importante que ésta en el incremento de los niveles séricos de IL-6 que tiene lugar con la edad.

También se ha estudiado genéticamente la posible relación entre fragilidad y andrógenos, cuyos efectos, además de estar mediados por el receptor de andrógenos (AR), están inversamente asociados con la longitud del

polimorfismo de repetición del triplete CAG, llamado (CAG) n en el exón 1 del gen AR (Travison T.G. *et al.*, 2010). En este sentido, no se encontró evidencia de que dicho polimorfismo en el gen AR pueda influir en la relación entre los niveles circulantes de andrógenos (testosterona total y libre), hormona luteinizante y globulina transportadora de hormonas sexuales y la fragilidad en varones de edad avanzada.

En relación al metabolismo lipoproteico, se intentó determinar si aquellos individuos portadores del alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (Apo E) tenían más riesgo de ser frágiles, no observándose relación alguna entre fragilidad y dicho polimorfismo (Rockwood K. *et al.*, 2008). Sin embargo, los individuos portadores del alelo $\epsilon 4$ tuvieron un mayor riesgo de muerte, tras ajustar por sexo y edad, pero esta relación no continuaba siendo significativa cuando se ajustaba por deterioro cognitivo.

1.1.5.4.2. Variación génica y manifestaciones clínicas de la fragilidad

En cuanto a la fuerza muscular, se ha intentado determinar si la presencia de variantes genéticas en el gen que codifica al factor neurotrófico ciliar (CNTF) están asociadas a la fuerza muscular en mujeres de edad avanzada (Arking D.E. *et al.*, 2006). De esta manera, se han encontrado 5 SNPs relacionados significativamente con la fuerza de agarre, después de ajustar por edad, BMI y osteoartritis. Sin embargo dichos SNPs no se relacionaron con la fragilidad.

Otro gen en el que se han encontrado polimorfismos relacionados con la fuerza muscular es aquel que codifica a la α -Actinina 3, una proteína que se encuentra en los sarcómeros del músculo esquelético de contracción rápida o tipo

II, donde se emplea para producir fuertes contracciones. Así pues, se ha descrito la asociación de dichos polimorfismos con la fuerza del cuádriceps en mujeres de edad avanzada, con la fuerza muscular e independencia para las ABVD en octogenarios y con la fuerza de agarre y la velocidad de la marcha en nonagenarios (Garatachea N. y Lucia A., 2013).

Polimorfismos en el gen que codifica a la proteína convertidora de la angiotensina se han relacionado con la fuerza de agarre y la velocidad de la marcha en hombres y mujeres septuagenarios (Yoshihara A. *et al.*, 2009). Sin embargo, no se encontró ninguna asociación entre la presencia de polimorfismos en este gen y la fuerza muscular o la independencia para las ABVD en octogenarios (Garatachea N. *et al.*, 2012).

Otros genes en los que se han estudiado polimorfismos relacionados con la fuerza muscular son: factores de crecimiento similar a la insulina (IGFs), miostatina (MSTN), folistatina (FST), proteínas desacopladoras mitocondriales (UCPs) y receptor de la vitamina D (VDR) (Garatachea N. y Lucia A., 2013)

1.2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Debido al aumento de la esperanza de vida que ha tenido lugar en los últimos años, las estimaciones de esperanza de vida activa (exenta de discapacidad) y de prevalencia de discapacidad entre la población anciana proporcionan las herramientas necesarias para conformar los actuales y futuros escenarios del gasto público y privado en estas materias.

La dependencia, considerada como el resultado final del envejecimiento no exitoso, es buena predictora de mortalidad y de consumo de recursos. Sin

embargo, la intervención sobre ella ofrece escasas ventajas en cuanto a la mejora de salud de la población, ya que las actuaciones (prevención terciaria) son costosas y en general poco eficaces. Por estas razones, es más interesante profundizar en el conocimiento de los mecanismos que conducen a dicha dependencia e identificar los factores implicados y susceptibles de ser tratados (prevención primaria y secundaria).

Por tanto, la presente tesis, mediante un estudio poblacional longitudinal, el Estudio de Toledo de Envejecimiento Saludable (ETES), pretende contribuir a la identificación del estado previo a la dependencia, la fragilidad, proporcionando posibles biomarcadores que puedan ayudar a la detección precoz de estos individuos. De esta manera, se podrían elaborar estrategias de intervención tempranas, aspirando así a reducir el número de futuras hospitalizaciones y el riesgo de dependencia. Este hecho supondría un importante ahorro económico y asistencial y, lo que es más importante, permitiría la consecución de una mejor calidad de vida de los individuos, es decir, el llamado *envejecimiento exitoso*.

1.3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis de la presente tesis es la siguiente:

“La fragilidad se caracteriza clínicamente por un deterioro funcional y cognitivo y podría ser diagnosticada precozmente mediante marcadores bioquímicos de deterioro cognitivo y de estrés oxidativo en plasma, así como mediante la presencia de variantes génicas en el ADN”.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis es encontrar posibles marcadores de fragilidad en ancianos pertenecientes al ETES.

1.4.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Determinar el grado de dependencia en las ABVD y en las AIVD de los individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles, y su posible relación con el sexo y la edad
2. Determinar el grado de deterioro cognitivo de los individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles, y su posible relación con el sexo y la edad
3. Determinar los niveles de BDNF en plasma en sujetos no frágiles, prefrágiles y frágiles, así como su posible relación con el sexo y la edad.
4. Determinar los niveles de peroxidación lipídica y de carbonilación proteica en plasma en sujetos no frágiles, prefrágiles y frágiles, así como su posible relación con el sexo y la edad

5. Determinar la posible existencia de variantes génicas raras y comunes (SNPs), genes y vías de señalización relacionados con la fragilidad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MUESTRA

Para la presente tesis se reclutaron un total de 776 sujetos (423 no frágiles, 288 prefrágiles y 65 frágiles), pertenecientes al (ETES).

Los criterios de inclusión para formar parte del ETES fueron los siguientes:

- Edad superior a los 65 años.
- Residentes en el Partido Judicial de Toledo y censados en el mismo.

Los criterios de exclusión del ETES fueron:

- Fallecimiento antes de la entrevista.
- Cambio de domicilio.
- Negativa a participar en el estudio.
- Imposibilidad de localizar al sujeto por causas no conocidas.

2.2. RECURSOS MATERIALES

2.2.1. RECURSOS MATERIALES CLÍNICOS

La fase clínica del presente estudio fue llevada a cabo en el Hospital Virgen del Valle (Complejo hospitalario de Toledo) y en el propio domicilio de los sujetos. En esta fase, que comprendió los años 2006-2009 se emplearon los siguientes materiales:

- Hoja de consentimiento informado (Anexo 2).
- Balanza de precisión digital SECA, modelo 803, capacidad 150 Kg, para determinar el peso del paciente.

- Tallímetro de pared SECA para la determinación de la altura. Rango de medición: 0-220 cm, peso: 202 g.
- Dinamómetro hidráulico JAMAR.
- Cinta métrica de 5 m de longitud.
- Cronómetro: Modelo No.TR 118, OREGON SCIENTIFIC.
- Material para extracción sanguínea:
 - Impresos de petición de analítica.
 - Nevera portátil KODIAK R16 (capacidad 11L) para transporte de muestras, con capacidad de regulación térmica.
 - Compresor o torniquete.
 - Contenedor de objetos punzantes BD (capacidad 1.5L).
 - Esparadrapo de papel antialérgico MEDAPORE.
 - Etiquetas para la identificación de las muestras.
 - Gasas estériles MEDICOMP.
 - Guantes estériles KIMTECH.
 - Jeringuillas y agujas intravenosas.
 - Povidona yodada.
 - Tubos (tipo y cantidad adecuada según pruebas pedidas).
- Escalas de valoración:
 - Escala *Mini-Mental Examination de Folstein* (Anexo 4).
 - Escala de fragilidad de Fried (Anexo 5).
 - Escala *Physical Activity Scale for the Elderly* (PASE) (Anexo 6).
 - Índice de Katz (Anexo 7).
 - Índice de Lawton y Brody (Anexo 8).

2.2.2. RECURSOS MATERIALES DE LABORATORIO

La fase experimental de este trabajo fue llevada a cabo en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y en el Centro Nacional de Genotipado - Instituto Carlos III de Santiago de Compostela, entre enero de 2011 y diciembre de 2012.

En este apartado se detallan los aparatos y reactivos de laboratorio utilizados para la medición de las distintas variables bioquímicas de la presente tesis.

2.2.2.1. Aparatos

- Balanzas:
 - Balanza de precisión Sartorius, modelo 6110 *balance*, sensibilidad ± 0.0001 g.
 - Balanza Gram precision, modelo AHZ, sensibilidad ± 0.01 g.
- Centrífugas:
 - Centrífuga Hettich, rotina 35 R para eppendorfs.
 - Centrífuga Thermo scientific, Sorvall legend XTR.
 - Centrífuga Sigma, 1-14.
- Espectrofotómetro: marca Cecil, CE3021, 3000 series.
- Sistema de purificación de agua: Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-R.
- pHmetro: marca Crison, *pHmeter*, GLP21, con elerctrodo incorporado INGLOD.
- Material para electroforesis (Figura 2.1):

Materiales y métodos

- Cubetas de electroforesis y electrotransferencia: casa SIGMA-ALDRICH.
- Fuentes de alimentación de electroforesis: Marca BIO-RAD, modelo PowerPac Basic.
- Material adicional para electroforesis: peines, cristales... Marca BIO-RAD.



Figura 2.1. Material para electroforesis

- Dispositivo fotográfico: Sistema fotográfico marca Polaroid, modelo MP 4+.
- Equipo de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Figura 2.2): Cromatógrafo DIONEX modelo Ultimate 3000, compuesto por:
 - Bomba marca SHIMADZU, modelo LC-10 AD.
 - Autoinyector SHIMADZU, modelo SIL-10AD vp.
 - Detector UV SHIMADZU, modelo SPD-10 AV.
 - Detector de fluorescencia RF 2000.
 - Controlador del equipo: programa Chromoleon.
 - Ordenador IBM XT modelo 486 con el programa de integración CLASSLC10.

- Columna TEKNOKROMA de fase reversa, modelo Spherisorb C18 cuyas dimensiones son 15 x 0.46 cm y de un tamaño de partícula de 5 μm .



Figura 2.2. Equipo de HPLC para la determinación de los niveles de MDA

- Campana de gases (flujo laminar vertical):
 - Marca Crumair, 1100-G A.
 - Marca Burdinola, OR-ST 1200.
- Baño seco: Marca Stuart, Block heater, SBH 130 D.
- Agitador magnético: Marca Stuart, Hotplate stirrer, SB 162-3.
- Baño caliente: Marca Clifton, modelo shaking bath, con agitación regulable.
- Congeladores:
 - (-80°C) Marca Revco, modelo ultima II.
 - (-80°C) Marca Platinum 500.
 - (-20°C) Marca Liebherr, modelo Comfort Nofrost.
 - (2°C) Nevera Lynx.

- Plataforma Gene Titan™ de Affymetrix, para el genotipado, empleando el Axiom® Exome 319 Array Plate.

2.2.2.2. Reactivos

- Determinación de BDNF en plasma: Se empleó el *BDNF Sandwich ELISA kit* de Millipore.
- Determinación de proteínas totales: Se empleó el *Protein ASSAY kit* de Sigma-Aldrich Química, que contiene el reactivo Lowry y Folin.
- Determinación de proteínas carboniladas: Se empleó el *OxyBlot protein oxidation detection Kit* de Millipore.
- Revelado de las membranas de los *Western blottings*: Para revelar las membranas de polivinildenedifloride (PVDF) (marca BIO-RAD) se empleó el *Protolot Western blot AP System kit*.
- Otros reactivos químicos: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) 1.5 M y 0.5 M, acrilamida/ bisacrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS), N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), β-Mercaptoetanol, ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de potasio (KOH), glicina, azul Comassie, rojo Ponceau, ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA), H₂O₂, etc. El resto de reactivos se obtuvieron de los laboratorios: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Molecular Probes, Panreac, Merck Biochemica (Alemania).

2.3. DISEÑO DEL ESTUDIO

El ETES fue concebido como un estudio longitudinal, de base poblacional, tipo cohorte abierta, formado por hombres y mujeres mayores de 65 años institucionalizados y no institucionalizados.

El ámbito del estudio fue el partido judicial de Toledo, una división administrativa de la provincia de Toledo que abarca tanto un ambiente rural como urbano (poblaciones: Bargas, Burguillos, Cuerva, Gálvez, Guadamur, Menasalbas, Mocejón, Nambroca, Navahermosa, Noez, Olías, Polán, Pulgar, San Martín de Montalbán, Toledo). Toledo pertenece a la Comunidad Autónoma de Castilla la Mancha, ubicada en el centro geográfico de España.

El ETES estuvo compuesto por dos cohortes de población. La primera cohorte estaba formada por los supervivientes del estudio poblacional de Toledo (García García F.J. *et al.*, 2001), cuyos integrantes eran hombres y mujeres mayores de 77 años en el 2006. La segunda cohorte estaba formada por individuos de edades comprendidas entre los 65 y los 76 años, seleccionados especialmente para este estudio en el 2006. En ambos estudios, los sujetos fueron elegidos mediante un muestreo estratificado bietápico tomando como base el padrón municipal y los censos electorales. De la primera cohorte de Toledo, 1560 sujetos fueron considerados aptos para el estudio. Con respecto a la nueva cohorte, se seleccionaron inicialmente 3676 sujetos. Del total de 5236, tras la exclusión de aquellos sujetos fallecidos, trasladados a otra provincia, que rechazaron participar o no pudieron ser localizados, fueron incluidos en el ETES 2488 sujetos. En la Figura 2.3 se muestra un esquema del diseño del ETES.

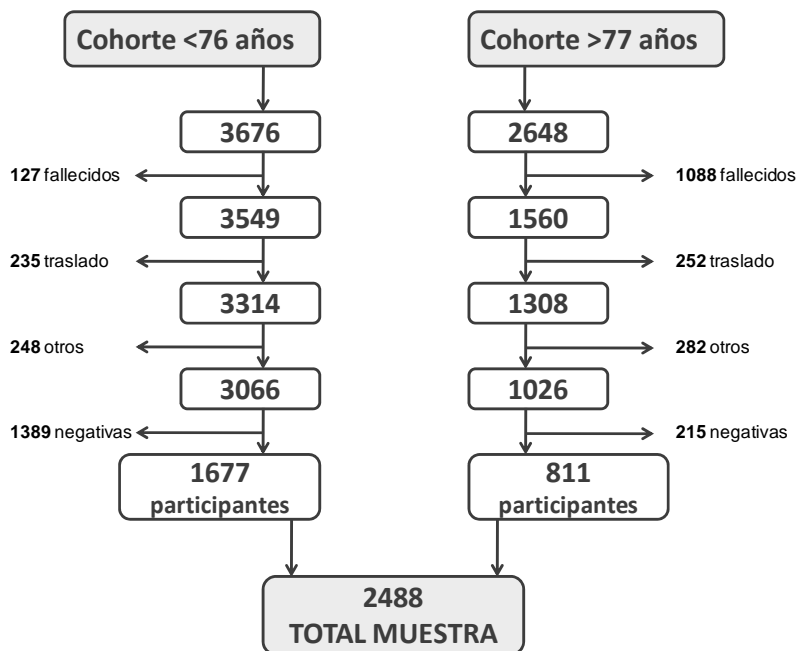


Figura 2.3. Esquema del diseño del ETES

El diseño fue concebido para realizar cortes transversales cada tres años a la cohorte seleccionada (la primera evaluación se realizó durante los años 2006-2009 y la segunda se está llevando a cabo en la actualidad), sustituyendo en cada corte las pérdidas y rejuveneciéndolas con la entrada de nuevas generaciones que accedan a los 65 años. Este diseño permitía realizar un seguimiento longitudinal de los sujetos y de las sucesivas cohortes etarias pudiendo así monitorizar, no sólo dichos sujetos, sino también la población. Las fases de este estudio se presentan en el siguiente apartado.

Una vez entrevistados y recogidos los datos clínicos de los sujetos, se seleccionaron para el estudio bioquímico un total de 776 sujetos de los cuales se disponía de muestra de plasma y fenotipo de fragilidad según los criterios de Fried (Fried L.P. *et al.*, 2001): 423 no frágiles, 288 prefrágiles y 65 frágiles.

El ETES se integró dentro de la Red Temática de Investigación en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) del Instituto Carlos III. Tuvo el aval científico de la Sociedad Española de Medicina Geriátrica (SEMEG) y surgió de la colaboración entre la propia Red de Envejecimiento (RETICEF), la Consejería de Sanidad de Castilla la Mancha y el Servicio de Salud de Castilla la Mancha (SESCAM).

El estudio se sometió a los principios de bioética recogidos en la declaración de Helsinki y a la legislación española pertinente. Además, contó con la aprobación del comité ético de investigación clínica del Hospital de Toledo (Anexo 3).

2.4. DETALLE DE LAS FASES

La Tabla 2.1 resume las diferentes etapas del estudio:

FASE	FECHA	DESCRIPCIÓN
1	Enero-diciembre 2006	Diseño del estudio ETES
		Selección de la muestra
2	Enero- junio 2007	Campaña informativa: <ul style="list-style-type: none"> • Medios de comunicación • Carta/ llamada teléfono
3	Junio 2007- junio 2008	Entrevista personal
		Valoración neuropsicológica
4	Septiembre 2008- septiembre 2009	Determinación fragilidad
		Valoración funcional (ABVD y AIVD)
		Extracción sanguínea

5	Diciembre 2010	Recepción de las muestras de plasma
6	Enero- marzo 2011	Determinación de MDA en plasma
7	Abril-julio 2011	Determinación de proteínas totales en plasma
		Determinación de proteínas oxidadas en plasma
8	Septiembre- noviembre 2011	Determinación de BDNF en plasma
9	Junio-diciembre 2012	Extracción ADN
		Genotipado muestras. Análisis SNPs
10	Enero-junio 2013	Análisis de datos, resultados y conclusión

Tabla 2.1. Etapas del estudio

A continuación, se procede a desarrollar cada fase, con sus correspondientes métodos:

2.4.1. PRIMERA FASE

Se realizó durante los meses enero-diciembre de 2006. En esta fase se procedió al diseño del estudio y a la selección de la muestra, en base a los criterios de inclusión y exclusión anteriormente mencionados.

Se solicitó al Instituto Nacional de Estadística (INE) la relación de las secciones electorales de Toledo, así como el número estimado de personas

mayores de 65 años de cada sección electoral. Con dicha relación de secciones electorales se constituyeron estratos con tamaño de población similar.

La selección de los sujetos incluidos en el estudio se realizó mediante muestreo estratificado bietápico. Como Unidades de Primera Etapa (UPE) se tomó la sección electoral, en tanto que los sujetos de todas las edades censados en cada una de las secciones electorales constituyeron las Unidades Finales de Muestreo. Se trata de un método equiprobabilístico en el que la selección de las UPE es proporcional al número de sujetos incluidos en cada una de ellas.

Se seleccionó un tamaño muestral de 4000 sujetos, 40 UPE a seleccionar y, por tanto, 100 sujetos por UPE. Para cada UPE seleccionada se recogió un listado con nombre, apellidos, dirección completa, fecha de nacimiento y sexo de las personas con 65 años o más. Una vez conocido el listado y número real de sujetos incluidos en cada UPE, mediante muestreo aleatorio simple se realizó la selección de los 100 sujetos en cada una de ellas.

2.4.2. SEGUNDA FASE

Se realizó en los meses enero-mayo del 2007. Previamente al comienzo del estudio, con la intención de concienciar a la población respecto a la importancia del mismo y la necesidad de colaboración ciudadana, se realizó una campaña informativa en los distintos medios de comunicación (prensa, radio, televisión...).

Por otro lado, se informó a los médicos de los centros de salud de los municipios elegidos y se les envió a los individuos seleccionados una carta explicándoles su selección para el estudio, la naturaleza e importancia del mismo

y su carácter voluntario y se solicitó el consentimiento informado por escrito (Anexo 2). La hoja de información fue aprobada por el comité de ética del Complejo Hospitalario de Toledo (Anexo 3).

Finalmente, días antes de la primera entrevista, se realizó una llamada telefónica a los sujetos recordándoles que un especialista acudiría a su casa.

2.4.3. TERCERA FASE

Se realizó en el período comprendido entre junio 2007 y junio 2008. Constó de una entrevista realizada por psicólogos en el propio domicilio del paciente, de 90 minutos de duración, que constaba de: datos sociodemográficos, comorbilidad (patología cardiovascular, respiratoria, reumática...), calidad de vida, evaluación neuropsicológica y del rasgo depresivo, hábitos tóxicos y encuesta nutricional, entre otros. De esta extensa entrevista, destacamos para la presente tesis la escala *Mini-Mental Examination de Folstein* (MMSE).

2.4.3.1. Valoración clínica del deterioro cognitivo: MMSE

La escala MMSE (Folstein M.F. *et al.*, 1975) puede ser administrada por personal no médico entrenado, no requiriéndose más de diez minutos para su aplicación. Consiste en la exploración de las áreas cognitivas más importantes (orientación, atención, cálculo, memoria y lenguaje) con una puntuación máxima global de 30:

- Puntuación de 25-30 → Normal. La persona presenta una adecuada capacidad cognoscitiva.
- De 24-21 puntos → Deterioro cognitivo leve.
- De 20-10 puntos → Deterioro cognitivo moderado.

- Por debajo de 10 → Deterioro cognitivo severo

La escala se detalla en el Anexo 4.

2.4.4. CUARTA FASE

Se realizó durante los meses septiembre 2008-septiembre 2009. Tres equipos de enfermería y uno de fisioterapeutas, previa cita, se desplazan al domicilio de los sujetos para realizar una valoración que constaba de: medidas de antropometría, tomas de tensión arterial y frecuencia cardíaca, pruebas de función respiratoria, electrocardiograma, cribado de arteriopatía periférica mediante *doppler*, valoración física, y un cribado de síntomas incontinencia urinaria. Además, se extrajeron muestras sanguíneas. A continuación se detallan los métodos empleados en esta fase.

2.4.4.1. Determinación de parámetros antropométricos para la determinación del índice de masa corporal: PESO Y TALLA

El **peso** se obtuvo en ayunas, indicando al sujeto que se colocara sobre la báscula descalzo y en ropa interior.

La **talla** se midió tal y como se explica a continuación:

1. Colocar en la pared una marca a 2.10 m desde el suelo.
2. Posición del sujeto: Erguido con los pies juntos, descalzo y de espaldas a la pared.
3. Medición:
 - Fijar el tallímetro (el orificio superior del tallímetro que coincida con la marca) y bajarlo hasta que toque la cabeza.

- Anotar la talla que marca la línea roja del tallímetro.

El índice de masa corporal (IMC) se calculó dividiendo el peso del paciente (en kilogramos) entre la talla (en metros) al cuadrado.

$$\text{IMC} = \text{peso} / \text{talla}^2$$

2.4.4.2. Valoración clínica de la fragilidad: CRITERIOS DE FRIED

Para la valoración de la fragilidad se emplearon los criterios de Fried (Fried L.P. *et al.*, 2001):

- Pérdida de peso involuntaria
- Sentimiento de agotamiento general
- Lentitud de la marcha
- Bajo nivel de actividad física
- Debilidad muscular

Los criterios se detallan en el Anexo 5. No obstante, a continuación se detallan los métodos empleados para evaluar cada criterio:

- Pérdida de peso involuntaria → Fue definida como una pérdida no intencionada de peso de 4.5 Kg o más durante el pasado año. Este dato se obtuvo mediante la pregunta, “¿en el último año, ha perdido usted más de 4.5 Kg de manera no intencionada (no debido a dieta o ejercicio)?”
- Sentimiento de agotamiento general → Fue referido por el propio sujeto, al contestar afirmativamente las siguientes preguntas del CES-D (*Center for Epidemiologic Studies Depression Scale*) (Orme J.G. *et al.*, 1986):

“sentía que todo lo que hacía era un gran esfuerzo” y “sentía que no podía continuar haciendo cosas”, por lo menos 3 ó 4 días a la semana.

- Lentitud de la marcha → Definida como una velocidad inferior a unos valores predeterminados de acuerdo al sexo y a la altura del sujeto (ver Anexo 5) en el test de velocidad de la marcha, en una distancia de 4.6 metros, de acuerdo con lo establecido en el *Short Physical Performance Battery* (Guralnik J.M. *et al.*, 1994). Se permitieron ayudas para la marcha (bastón, muletas, andador...). El procedimiento se detalla a continuación:
 1. Dado que su objetivo es determinar su velocidad habitual de marcha, no se le anima a que marche rápido. Para evitar los sesgos del tiempo de reacción, de la aceleración inicial, y de la posible desaceleración final, tanto a la salida del test como a su llegada, se sitúan las señales de salida y de llegada alejados 0.50 m del inicio y final del metraje testado (4.6 m). Dichas señales se marcan con cintas adhesivas en el suelo.
 2. Explicar al sujeto en qué consiste la prueba: que “camine como lo hace normalmente en la calle”, “con naturalidad” y que no se detenga hasta cruzar las cintas (se insiste en que “no tenga miedo a caerse”, que “nos encontramos a su lado”).
 3. Realizar una demostración de prueba y, posteriormente, el sujeto la realiza dos veces, cronometrando ambos tiempos y obteniendo la media de los datos. En el caso de sujetos muy deteriorados, solamente realiza una única prueba.
- Bajo nivel de actividad física → Fue definido como el peor quintil en la puntuación del *Physical Activity Scale for the Elderly* (PASE) (Schuit A.J. *et al.*, 1997), adjuntado en al Anexo 6, lo cual corresponde a un nivel de

actividad física inferior a 383 Kcal/ semana para los hombres y 270 para las mujeres.

- Debilidad muscular→ Para su valoración, se determinó la fuerza máxima de agarre (*handgrip strength*) de la mano dominante, mediante un dinamómetro hidráulico Jamar, tal y como se explica a continuación:
 1. Posición: sentado en una silla sin reposabrazos, con los brazos colgados a ambos lados del cuerpo.
 2. Previamente al comienzo del ejercicio, a modo de calentamiento, realizar diez presiones suaves y progresivas con la mano que se va a utilizar en la prueba (mano dominante), seguido de estiramiento de los dedos.
 3. En la posición inicial, el sujeto coge el dinamómetro y tras explicarle en qué consiste la prueba (se le explica que no se trata de mantenerlo el mayor tiempo posible, sino de hacer la mayor presión posible), se le indica que realice un pre-test submáximo, es decir, sin realizar toda la fuerza que sea capaz, para que se familiarice con el aparato.
 4. Tras dos minutos de intervalo, se procede a realizar el test, animándole a que lo haga con la mayor fuerza posible.
 5. Repetir el ejercicio en tres ocasiones con un intervalo de un minuto entere cada intento y anotar todos los resultados, junto con la mejor medida.

Así, la debilidad muscular fue definida como un valor en dicha dinamometría inferior a unos valores predeterminados, ajustados por sexo e IMC (Kg/m^2), tal y como se muestra en el Anexo 5.

Se asignó un punto a cada criterio positivo, construyendo una puntuación final formada por la suma de las 5 puntuaciones. De acuerdo con esta puntuación, los sujetos fueron clasificados de la siguiente manera:

- No frágiles: 0 puntos
- Prefrágiles: 1 ó 2 puntos
- Frágiles: 3 ó más puntos

2.4.4.3. Valoración clínica de la independencia para la realización de las actividades básicas de la vida diaria (ABVD): ÍNDICE DE KATZ

La escala de Katz evalúa 6 ABVD (baño, vestido, uso del retrete, movilidad, continencia y alimentación), proporcionando un índice de autonomía-dependencia en un breve tiempo de administración (unos veinte minutos), y no requiriendo de un entrevistador especialmente entrenado para tal fin (Katz S. *et al.*, 1963).

La puntuación puede realizarse de dos maneras: de forma jerárquica, es decir, clasificando al sujeto en 7 grupos denominados por letras (A-G), o de forma dicotómica, otorgando 0 ó 1 puntos a cada ítem según el sujeto sea dependiente o independiente respectivamente, clasificándole así en siete posibles grupos, esta vez numéricos (0-6). Dado que el objetivo de la presente tesis fue relacionar fragilidad con dependencia (y no analizar las actividades concretas en las cuales el sujeto es dependiente), se utilizó la segunda forma de valoración, introduciendo los datos en SPSS de manera cuantitativa tal y como se especifica a continuación:

- 0 → Dependiente en las 6 funciones.
- 1 → Dependiente en 5 funciones.
- 2 → Dependiente en 4 funciones.
- 3 → Dependiente en 3 funciones.

- 4→ Dependiente en 2 funciones.
- 5→ Dependiente en 1 función.
- 6→ Independiente en todas las funciones.

La escala se detalla en el Anexo 7.

2.4.4.4. Valoración clínica de la independencia para la realización de las actividades instrumentales de la vida diaria (AIVD): ÍNDICE DE LAWTON Y BRODY

El índice de Lawton y Brody recoge información de manera objetiva y breve sobre ocho AIVD: Capacidad para utilizar el teléfono, ir de compras, preparar la comida, realizar tareas del hogar, lavar la ropa, utilizar algún medio de transporte, controlar la medicación y administrar el dinero (Lawton M.P. y Brody E.M., 1969). A cada ítem se le asigna un valor numérico: 1 (independiente) ó 0 (dependiente). La puntuación final se interpretaría de la siguiente manera:

- 8 →Máxima independencia.
- 0→Máxima dependencia.

La escala se detalla en el Anexo 8.

2.4.4.5. Extracción sanguínea

❖ **Procedimiento de la extracción sanguínea**

Las muestras de sangre fueron tomadas en el propio domicilio del sujeto, en ayunas. A continuación se indican los puntos más importantes del método de extracción:

1. Colocar al sujeto en posición adecuada con el brazo en hiperextensión (el sujeto nunca debe de estar de pie), y el compresor 7-10 cm por encima de la zona de punción elegida.
2. Localizar la vena más adecuada por calibre y movilidad, preferentemente en la fosa antecubital, aplicar antiséptico sobre la zona e introducir la jeringuilla.
3. Llenar cada tubo con cuidado hasta que exista la suficiente cantidad de sangre. Se deben llenar primero los tubos para muestra coagulada y terminar con los tubos con anticoagulantes. Como anticoagulante para el plasma y sangre total se utilizó ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA). Los tubos con anticoagulante deben llenarse hasta consumir todo el vacío para mantener la proporción correcta de anticoagulante y sangre. Una vez llenos, invertir varias veces los tubos para que sangre y EDTA se mezclen.
4. Retirar la aguja y ejercer presión sobre la zona de punción con la gasa hasta que deje de sangrar.
5. Meter los tubos o bien directamente en un congelador de -80°C (uno de estos crioviales de sangre total fue enviado al Centro Nacional de Genotipado - Instituto Carlos III de Santiago de Compostela para la obtención de ADN) o en la nevera para ser transportados al laboratorio para la obtención de plasma.

❖ Procedimiento de la obtención del plasma

Una vez extraída la sangre con EDTA, se trasladó al laboratorio lo más rápidamente posible, en un tiempo no superior a una hora después de la extracción, y se centrifugó durante 10 minutos a 2200 G. El plasma sobrenadante se aspiró cuidadosamente y se alícuotó en dos crioviales de 1.5 mL cada uno (cada

criovial debía estar adecuadamente etiquetado e identificado). Seguidamente, éstos se almacenaron en cajas de crioolmacenaje y se guardaron en un congelador de -80°C (uno fue enviado a la Universidad de Valencia para la determinación de los niveles de BDNF, MDA y proteínas carboniladas).

2.4.5. QUINTA FASE

Se llevó a cabo durante el mes de diciembre de 2010 en el laboratorio de Fisiología de la Universidad de Valencia. Se recibieron las muestras de plasma (alícuota de 1,5 mL de cada sujeto) y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su posterior análisis. En total se recibieron un total de 776 muestras del ETES para la determinación de datos bioquímicos, distribuidas tal y como se muestra en la Figura 2.4.

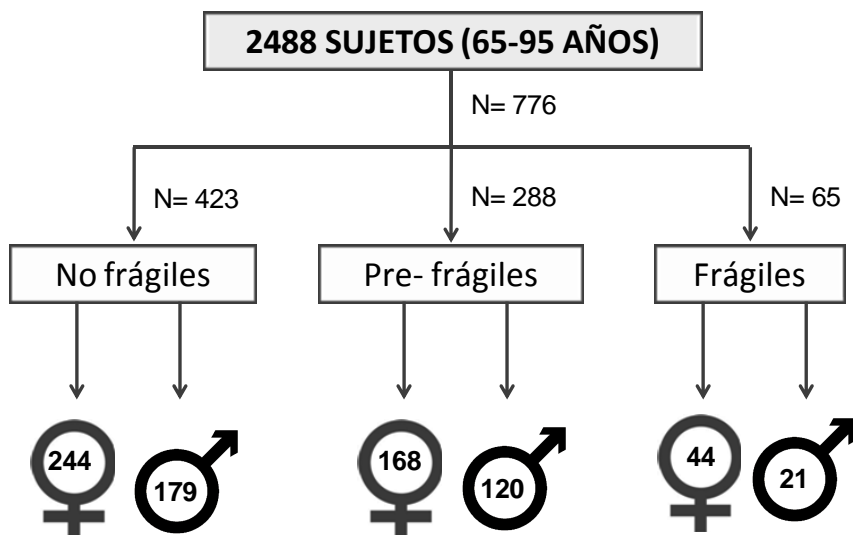


Figura 2.4. Distribución de la muestra para datos bioquímicos

2.4.6. SEXTA FASE

Comprendió los meses enero, febrero y marzo del 2011. Durante estos meses se determinaron de los niveles de MDA en plasma mediante HPLC.

2.4.6.1. Determinación de niveles de MDA en plasma

Para su determinación se utilizó el método descrito por Wong y colaboradores (Wong S.H. *et al.*, 1987), en el cual, una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) produciendo un cromógeno rosado con un máximo de absorción entre $\lambda = 532-535$ nm. Los resultados obtenidos se expresarán por mg de proteína total o por mL de plasma. A continuación se describe dicho método:

a) Preparación de los reactivos

- Tampón acetato sódico anhidro 2 M, pH 3.5, con TBA 0.2%: Para preparar 1 L se toman 119 mL de ácido acético glacial (pureza 98%) y se le añaden a unos 600 mL de agua desionizada ("mili-Q"). Se ajusta el pH hasta 3.5 con hidróxido de sodio (NaOH) 10 M. A continuación, se añade a la solución 2 g de ácido tiobarbitúrico y se mantiene en agitación, a 50-60°C, hasta la total disolución del TBA. Se comprueba que el pH se mantiene y, si no es así, se vuelve a ajustar. Finalmente, se enrasa el volumen a 1 L y se guarda protegido de la luz a 4° C.

- Tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 6.8: Para preparar 500 mL se pesan 3.4 g de KH_2PO_4 y se añaden a unos 400 mL de agua desionizada. A continuación, se ajusta el pH con KOH (1 M) hasta 6.8 y se enrasa con agua desionizada hasta alcanzar el volumen final. Posteriormente, se guarda a 4° C.

- Tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 3.5: Para preparar 500 mL se pesan 3.4 g de KH_2PO_4 y se añaden a unos 400 mL de agua desionizada; se ajusta el pH con HCl (1 M) hasta 3.5 y se enrasa con agua desionizada hasta el volumen final. Se guarda también a 4° C.

b) Preparación de los patrones

Dado que la identificación y cuantificación del MDA de las muestras analizadas se llevó a cabo gracias a una curva patrón, previamente al ensayo hubo que prepararla. Para ello:

1. Se parte de una solución comercial de MDA-bis (Merck) que está a una concentración de 12.2 M. Para obtener una solución inicial 10 mM, se diluyen 410 μ L de MDA 12.2 M en 500 mL de agua desionizada.
2. Si se diluye la solución anterior a la mitad, se obtiene entonces una solución 5 mM, a partir de la cual se consiguen los siguientes puntos para la recta patrón:
 - 50 nmol/mL (diluir 1/100 la solución 5 mM de MDA)
 - 25 nmol/mL (diluir a la mitad la solución anterior)
 - 12.5 nmol/mL (diluir a la mitad la solución anterior)
 - 6.25 nmol/mL (diluir a la mitad la solución anterior)
 - 3.125 nmol/mL (diluir a la mitad la solución anterior)
 - 1.562 nmol/mL (diluir a la mitad la solución anterior)
 - 0.781 nmol/mL (diluir a la mitad la solución anterior)
 - Blanco (sólo agua desionizada)

c) Procedimiento de derivatización

1. A 500 μ L del tampón inicial (con TBA) se le añaden 25 μ L de plasma.

2. La preparación se incuba durante 60 minutos a una temperatura de 95°C. Es en este paso donde se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y la consiguiente liberación de moléculas de MDA, que se conjugan con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), por tanto, lo que se determina es el aducto MDA-TBA₂, como índice de peroxidación lipídica.
3. Al sacarlas, las muestras deben mantenerse en hielo.
4. Añadir 500 µL del tampón de KH₂PO₄ a pH 6.8 a cada muestra. Agitar. Este paso es crítico ya que el aducto MDA-TBA₂ es inestable en el rango de pH neutro-básico, por lo que debe hacerse con rapidez.
5. Centrifugar durante 5 min. a 13000 g, a una temperatura de 4°C.
6. A 200 µL del sobrenadante añadirle 200 µL del tampón KH₂PO₄ 50 mM, pH 3.5 y agitar.
7. Tomar 200 µL y colocarlos en un vial para realizar el análisis por HPLC.

d) Preparación de las fases móviles para HPLC

Se trata de un método “isocrático”, por tanto, se necesitan 2 fases diferentes: la “fase de lavado” y la “fase de elución”:

- *Fase de lavado (Fase B)*: está constituida por una mezcla de acetonitrilo/ agua desionizada al 70%, ambos de máxima pureza y el agua del tipo “mili-Q”.

- *Fase de elución (Fase A)*: La sal que contiene esta fase es KH₂PO₄ 50 mM, pH 6.8. La relación es de 83/17 (KH₂PO₄ 50 mM, pH 6.8/ acetonitrilo). El modo de preparación es el siguiente:

1. Pesar 13.6 g de KH₂PO₄ y disolverlos en unos 1800 mL de agua desionizada (“mili-Q”).
2. Ajustar el pH de esta disolución con KOH 1 M.
3. Enrasar hasta 2000 mL.

4. Añadir 410 mL de acetonitrilo. Esta solución debe homogeneizarse bien.
5. La solución debe filtrarse, mediante bomba de vacío y filtro de 0.22 micras (Millipore).

Antes de pasar por el HPLC, ambas fases deben desgasificarse por baño de ultrasonidos unos 20 minutos.

e) Condiciones cromatográficas

- Flujo de las fases: 1 mL/min
- Detección en HPLC: se utilizó el detector UV a 532 nm.
- Columna: C18 Spherisorb de 15 cm de longitud y 5 μm de partícula.

f) Método cromatográfico

Al ser un método isocrático, sólo se necesita programar el tiempo que va a estar pasando cada una de las fases líquidas correspondientes. Un cromatograma conlleva unos 30 minutos y la secuencia de las fases móviles a través del HPLC es la que se muestra en la Figura 2.5:




Fase A	Fase B	Fase A
		
ELUCIÓN DE LA MUESTRA	LIMPIEZA DE LA COLUMNA	PREPARACIÓN DE COLUMNA
13minutos	9minutos	8minutos

Figura 2.5. Programación de la duración (minutos) de las Fases A y B, durante un cromatograma del análisis de Malondialdehído (MDA).

Una programación de muestras supone el repetir cada secuenciación anterior tantas veces como muestras y patrones se deseen analizar, de tal manera que se obtiene de cada muestra un cromatograma como el que se muestra en la siguiente figura (Figura 2.6).

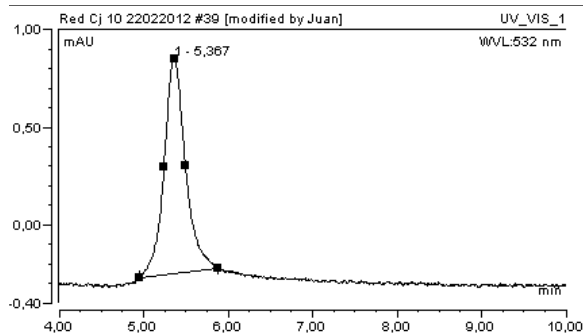


Figura 2.6. Cromatograma de una muestra problema.

2.4.7. SÉPTIMA FASE

Esta fase se llevó a cabo entre los meses abril-julio 2011. Del total de muestras, una persona externa al laboratorio seleccionó 53 no frágiles, 53 prefrágiles y 53 frágiles. Las muestras fueron procesadas para la determinación de las proteínas totales plasmáticas y los niveles de proteínas oxidadas en plasma.

2.4.7.1. Determinación de proteínas totales plasmáticas: MÉTODO DE LOWRY

Se empleó el *Protein Assay Kit*, basado en el método de Lowry (Lowry O.H. *et al.*, 1951), un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. El reactivo de Lowry, incluido en el kit, contiene SDS, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino, que se une a las

proteínas. El reactivo de Folin, también incluido en el kit, contiene fenol, que al interactuar con el tartrato da lugar a un compuesto de color azul.

A la muestra de plasma se le añadieron los reactivos antes mencionados, formándose un complejo coloreado, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. A continuación se detalla dicho procedimiento:

a) Preparación de los reactivos

- *Reactivo Lowry*: Añadir 40 mL de agua desionizada al reactivo comercial *Lowry Reagent Powder*. A continuación, mezclar hasta disolver por completo. Guardar a temperatura ambiente.

- *Reactivo Folin*: Añadir 90 mL de agua desionizada a 18 mL de la solución *Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent* en una botella opaca y mezclar bien. Guardar a temperatura ambiente.

b) Preparación de la recta patrón

Dado que, como hemos mencionado anteriormente, la cuantificación de proteínas totales de las muestras analizadas se llevó a cabo gracias a una curva patrón, previamente al ensayo hubo que prepararla:

1. Preparar un concentrado de seroalbúmina bovina (BSA) (10 mg/mL): pesar 10 mg de BSA en un eppendorf y añadirle 1 mL de agua desionizada ("milli Q").
2. Realizar diferentes diluciones a partir de la solución anterior, para conseguir los siguientes puntos para nuestra recta patrón:
 - 5 mg/mL (diluir a la mitad la solución de 10 mg/mL).

- 2.5 mg/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- 1 mg/mL (diluir 1/10 la solución de 10 mg/mL).
- 0.1 mg/mL (diluir 1/10 la solución anterior).
- Blanco (sólo agua desionizada).

c) Protocolo

1. En un eppendorf pipetear 490 μ L de agua desionizada y 10 μ L de la muestra.
2. Añadir 500 μ L del reactivo de Lowry e incubar 20 minutos en oscuridad.
3. Añadir 250 μ L del reactivo de Folin Ciocalteu e incubar 30 minutos en oscuridad.
4. Medir la absorbancia a $\lambda = 660$ nm.

d) Cuantificación de los resultados

Para calcular las absorbancias de las diferentes muestras problema, se descartaron las llamadas “interferencias” (otros solventes o reactivos del sistema que absorben a la misma longitud de onda que dichas muestras). Para ello, se preparó una muestra que contenía todos los componentes del sistema menos aquel que se desea medir (muestra o patrón). Esta muestra se llama blanco y la absorbancia de éste debe restarse a las muestras problema y a los patrones, o bien, con el blanco se calibra el instrumento a absorbancia igual a 0, es decir, 100% de transmisión.

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs muestra o patrón} - \text{Abs blanco}$$

El resultado se expresó en una gráfica de la absorbancia en función de la concentración (mg/mL). Si el sistema seguía la ley de Lambert-Beer, se obtenía

una línea recta que pasaba cerca del origen. A continuación, se determinó gráficamente la concentración de la muestra desconocida dibujando la absorbancia frente concentraciones conocidas de nuestro patrón interno (BSA). Se escogió la parte lineal y se calculó la recta de regresión lineal que mejor se ajustaba y a ésta se interpolaron los datos de absorción de nuestras muestras de plasma (Figura 2.7).

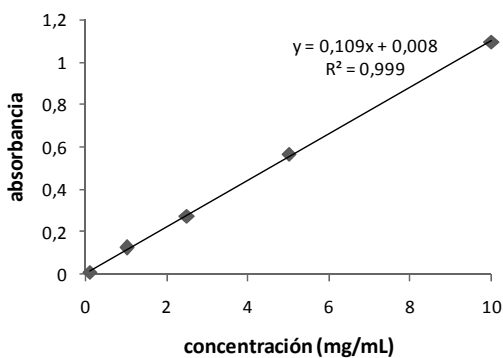


Figura 2.7. Ejemplo de recta patrón para la determinación de la concentración de proteínas en mg/mL (eje de las x) en función de la absorbancia a $\lambda = 660 \text{ nm}$.

2.4.7.2. Determinación de proteínas carboniladas en plasma: WESTERN BLOTTING

Para la determinación de proteínas carboniladas se empleó el método *Western blotting* o *immunoblotting*, mediante el *OxyBlot protein oxidation detection Kit*.

La electroforesis fue llevada a cabo en geles con una matriz de poliacrilamida (PAGE), en condiciones desnaturalizantes, ya que para conseguir que las proteínas se separen por su peso molecular, es imprescindible que éstas se encuentren completamente desnaturalizadas, en su estructura primaria. Para

ello, se utilizó la combinación de un detergente desnaturizante (dodecilsulfato sódico, SDS) y un agente reductor (β - mercaptoetanol). A continuación se detalla el procedimiento completo:

a) Derivatización de las muestras

1. Añadir 5 μ L de muestra a un eppendorf, o el volumen necesario para tener 20 μ g de proteína. Si el volumen es inferior, ajustar a 5 μ L con agua desionizada.
2. Añadir 5 μ L de SDS al 12% p/v. En el caso de que el volumen de la muestra exceda los 5 μ L, se corrige añadiendo menor volumen de SDS a mayor concentración.
3. Añadir 10 μ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) a cada muestra, que marcará los grupos carbonilo. También se prepararán muestras como controles negativos, a los que se añade solución de derivatización control.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Añadir 7.5 μ L de la solución de neutralización. Si no se había añadido un agente reductor a la muestra durante el homogenado, añadir 1-1.5 μ L de β -mercaptoetanol.

b) *Western blotting*

1. Cargar las muestras en los geles: Se carga un volumen total por muestra de 28 μ L en cada pocillo (15 pocillos en total), empleando geles discontinuos al 12.5% de Acrilamida (29:1 Acrilamida: Bisacrilamida) con un 0.1% de SDS.

2. Electroforesis (Figura 2.8): Se aplica un campo eléctrico de voltaje constante de 20 miliamperios (mA) durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3).

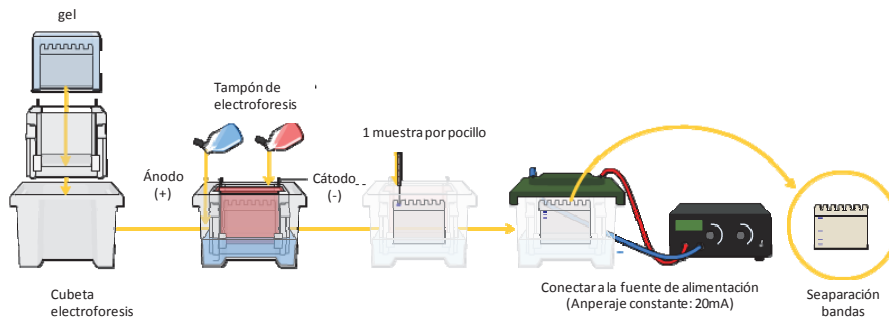


Figura 2.8. Esquema electroforesis SDS-PAGE

3. Transferencia: Una vez finalizado el desplazamiento electroforético, el gel se transfiere (*blotting*) a una membrana de PVDF (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas, por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA). El proceso se mantiene de forma que pasan 170 mA por cada membrana de la cual se hace transferencia, en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8.3).
4. Bloqueo: Tras la transferencia, las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de BSA, 0.1% Tween-20 en 1x PBS (PBS-T).
5. Lavados: Se realiza 1 lavado de 15 minutos y dos de 5 minutos con 10 mL de PBS-T.

6. Anticuerpo primario: Las membranas se incuban durante toda la noche a 4°C en agitación orbital, en tampón de anticuerpo primario (5% BSA, 0.1 % Tween-20 en 1x PBS) con una dilución de anticuerpo primario 1:150.
7. Lavados: Se repite el paso 5.
8. Las membranas son incubadas 60 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo a la concentración 1:300.
9. Lavados: Se repite el paso 5.
10. Revelado: La membrana se incuba 1-5 minutos con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se revela con un detector quimioluminiscente, mediante el programa *Image Gauge* V4.0 de FUJIFILM.

c) Cuantificación de los resultados

Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato digital TIF para poder realizar la densitometría de las bandas, utilizando el programa “Image J”. Como control de carga, se tiñeron las membranas con rojo Ponceau. Así, se calculó la densitometría de la membrana haciendo un ratio: densitometría de la carbonilación de proteínas/ densitometría de la membrana teñida con rojo Ponceau, expresándose el resultados como unidades arbitrarias de proteínas oxidadas.

2.4.8. OCTAVA FASE

Esta fase comprendió los meses de septiembre, octubre y noviembre del 2011. Se determinaron los niveles de BDNF en plasma mediante ensayo por

inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En este caso, se analizaron muestras procedentes de 77 individuos no frágiles, 73 prefrágiles y 76 frágiles.

2.4.8.1. Determinación de los niveles de BDNF en plasma: ELISA

Los niveles de BDNF en plasma fueron determinados mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), en concreto con el “BDNF Sandwich ELISA Kit”.

La técnica ELISA para BDNF, se basa en que el antígeno a determinar (en este caso, la proteína BDNF) es reconocido específicamente por un anticuerpo primario llamado anticuerpo biotinilado (Figura 2.9). A su vez, este anticuerpo primario es reconocido por un anticuerpo secundario, que está conjugado con la actividad enzimática de tipo peroxidasa (Estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano). Mediante esta actividad enzimática, el agua oxigenada (H_2O_2) presente en el tampón, se desdobra en H_2O y O_2 , el cual produce una reacción colorimétrica, como consecuencia de la oxidación del sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB). Finalmente, la intensidad de la reacción colorimétrica (que es proporcional a la concentración de BDNF), se cuantifica por espectrofotometría mediante la lectura de la absorbancia a $\lambda = 495$ nm de longitud de onda. Los resultados se determinan interpolando a la curva patrón de concentraciones conocidas, los valores de absorbancia de cada una de las muestras a analizar.

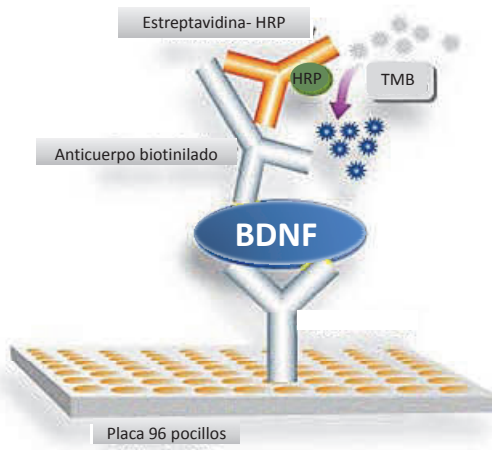


Figura 2.9. Unión específica antígeno anticuerpo en el método ELISA

El método detallado se especifica a continuación:

a) Preparación de los reactivos

- *BDNF standard*: Reconstituir el *BDNF standard* añadiendo 1500 μL de *sample diluent*, de tal manera que contenga una concentración relativa de BDNF de 10000 pg/mL . Este reactivo será empleado para confeccionar la curva patrón.

b) Preparación de la recta patrón

Dado que la determinación de los niveles de BDNF de las muestras analizadas se llevó a cabo gracias a una curva patrón, previamente al ensayo hubo que prepararla del siguiente modo:

1. Preparar el concentrado de 500 pg/mL : a 50 μL de BDNF estándar se le añaden 950 μL de *sample diluent*.

2. Realizar diferentes diluciones a partir de la solución anterior, para conseguir los siguientes puntos para nuestra recta patrón:
 - 250 pg/mL (diluir a la mitad la solución de 500pg/mL)
 - 125 pg/mL (diluir a la mitad la solución anterior)
 - 62.5 pg/mL (diluir a la mitad la solución anterior)
 - 31.25 pg/mL (diluir a la mitad la solución anterior)
 - 15.6 pg/mL (diluir a la mitad la solución anterior)
 - 7.82 pg/mL (diluir a la mitad la solución anterior)
 - Blanco (sólo *sample diluent*)

c) Protocolo

1. Centrifugar el plasma a 10000 g a 4°C, durante 10 minutos.
2. Diluir las muestras 1: 20 con el *sample diluent*.
3. Añadir 100 µL de las diferentes diluciones de la curva en cada pocillo (por duplicado).
4. Añadir 100 µL de muestra en cada pocillo (por duplicado) y sellar la placa.
5. Incubar a 4°C toda la noche, en agitación suave.

Al día siguiente:

6. Retirar con cuidado el sellado de la placa y lavar 4 veces con la solución de lavado (1: 10).
7. Añadir 100 µL del anticuerpo biotinilado Anti-BDNF (1:1000) y sellar nuevamente la placa.
8. Incubar a temperatura ambiente 2-3 horas, en agitación (400 rpm).
9. Retirar con cuidado el sellado de la placa y lavar 4 veces con la solución de lavado (1:10).

10. Añadir 100 μL de la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (1:1000) y sellar la placa de nuevo.
11. Incubar a temperatura ambiente 1 hora, en agitación (400 rpm).
12. Retirar con cuidado el sellado de la placa y lavar 4 veces con la solución de lavado (1:10).
13. Añadir 100 μL de TMB/E en cada pocillo, previamente atemperado.
14. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
15. Detener la reacción con 100 μL de la *stop solution*.
16. Inmediatamente después, leer la absorbancia a $\lambda = 450\text{nm}$ en el espectrofotómetro.

d) Cuantificación de los resultados

Los datos obtenidos se determinaron interpolando las absorbancias de nuestras muestras de plasma a la recta patrón o curva estándar realizada de concentraciones conocidas. Los valores se expresaron como pg/mg de proteína.

2.4.9. NOVENA FASE

Esta fase tuvo lugar de junio a diciembre del 2012, en el Centro Nacional de Genotipado de Santiago de Compostela, que cuenta con la tecnología *AxiomTM Genotyping* de Affymetrix. En primer lugar, el ADN total se amplificó y fragmentó hasta 25-125 pares de bases. Estos fragmentos se purificaron y resuspendieron con la solución de hibridación que se transfirió al *GeneTitan Instrument* de Affymetrix para seguir su procesamiento completamente automatizado (hibridación en las placas de 96 pocillos, ligado, lavado, tinción, estabilización y escaneado). Las imágenes se procesaron automáticamente para obtener los genotipos con el algoritmo *Axiom GT1*, disponible a través del programa

Genotyping Console (GTC) de Affymetrix. El proceso detallado se describe a continuación.

2.4.9.1. Genotipado de las muestras

a) Preparación del ADN genómico:

- El ADN se extrae a partir de 300 μ L de sangre con el *Chemagic DNA blood kit*, empleando el robot *Chemagic Magnetic Separation Module I*, con el cabezal de 96 puntas. La pureza del ADN viene indicada por la relación entre las densidades ópticas (OD) OD_{260}/OD_{280} entre 1.8 y 2 y la relación OD_{260}/OD_{230} superior a 1.5.
- Se comprueba el tamaño del ADN genómico empleando geles de agarosa al 1% p/v, cargando 10-20 ng de ADN por pocillo. Aproximadamente el 90% del ADN genómico debe tener un tamaño superior a 10 kilobases.
- Cuantificación y dilución con el *Affymetrix® Axiom 2.0 Reagent kit*. Para el *Axiom exome array* se necesita cargar en la placa 200 ng de ADN. Para ello, es necesario diluir las muestras hasta una concentración de 10 ng/ μ L en tampón Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA). A continuación se dispensa en las placas de 96 pocillos 20 μ L de cada muestra (equivalente a 200 ng de ADN) y del control de referencia *Axiom Reference Genomic ADN 103*.

b) Amplificación del ADN

Todos los reactivos estaban incluidos en el *Affymetrix® Axiom 2.0 Reagent kit*:

1. Añadir 20 μ L de la solución de desnaturalización. Agitar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente, incluyendo una centrifugación de 1 minuto a 1000 rpm (a partir de ahora, centrifugación breve).

2. Añadir 130 μL de la solución de neutralización a cada muestra, agitar y hacer una centrifugación breve.
3. Añadir 230 μL de la solución de amplificación (contiene 5 μL de la enzima de amplificación), agitar 2 veces y hacer un centrifugación breve.
4. Incubar 24h en un horno a 37°C.

c) Fragmentación y precipitación

Todos los reactivos estaban incluidos en el *Affymetrix® Axiom 2.0 Reagent kit*.

1. Detener la reacción de amplificación incubando la placa 20 minutos en un horno a 65°C. A continuación, incubar nuevamente en dicho horno, esta vez a 37°C, durante 45 minutos.
2. Añadir 57 μL la solución de fragmentación. Agitar y hacer una centrifugación breve.
3. Incubar 30 minutos en un horno a 37°C.
4. Detener la reacción con 19 μL de la *stop solution*, agitar y hacer una centrifugación breve.
5. Añadir 240 μL de la solución de precipitación, agitar y hacer una centrifugación breve.
6. Añadir 600 μL de isopropanol, resuspendiendo con la pipeta 5-7 veces, hasta que la solución sea homogénea.
7. Congelar a -20°C e incubar 24 horas.

d) Secado y resuspensión en la solución de hibridación

1. Centrifugar la placa 40 minutos a 4°C a 3200 g. Descartar sobrenadante e incubar 30 minutos en un horno a 37°C para secar el precipitado.

2. Añadir 35 μL del tampón de resuspensión, evitando tocar el precipitado con la punta, y colocar en el agitador durante 10 minutos. A continuación, hacer una centrifugación breve. Transferir el volumen resuspendido a otra placa.
3. Añadir 80 μL de la solución de hibridación, agitar y hacer una centrifugación breve.

e) Desnaturalización e hibridación

1. Colocar la placa en el termociclador (95°C 10 minutos, 48°C 3 minutos, 48°C indefinido).
2. Transferir las muestras desnaturalizadas al *GeneTitan MC Instrument*, donde se llevará a cabo la hibridación de las muestras durante aproximadamente 24h.
3. Posteriormente, tienen lugar los siguientes pasos: ligado, lavado, fijación, tinción y estabilización, durante aproximadamente 5h.

f) Escaneo

1. La placa se desplaza al escáner del *GeneTitan MC Instrument* y se escanea cada muestra (para 96 muestras este proceso dura 7.5h), obteniendo de este modo imágenes que se procesarán automáticamente para obtener los genotipos, tal y como se describe en el siguiente apartado.

2.4.9.2. Algoritmo del genotipado y controles de calidad

Una vez obtenidas las imágenes de cada muestra en archivos, compatibles con el algoritmo *Axiom GT1*, se procesaron mediante el programa *Genotyping Console* (GTC) de Affymetrix 4.1 para obtener el genotipo. El proceso constó de dos fases:

1ª fase→ Se descartaron aquellas muestras que no sobrepasaban los controles de calidad:

- Filtrado por *dishQC*: se eliminan las muestras con valor inferior a 0.82.
- Filtrado por *call rate*: se eliminan las muestras con valor inferior a 97%
- Control de calidad por placa: se descartan aquellas placas con un bajo rendimiento.

2ª fase→ Se genotiparon el resto de muestras. Con el *Axiom exome array* de Affymetrix se genotiparon 295988 SNPs.

2.4.10. DÉCIMA FASE

Corresponde al período comprendido entre enero y junio del 2013. Se procedió al análisis estadístico de los resultados, tal y como se detalla en el siguiente apartado.

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.5.1. ANÁLISIS DE VARIABLES CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS

Se utilizaron dos bases de datos. Una inicial donde se recogieron todos los datos de cada uno de los 2488 sujetos pertenecientes al ETES, y otra extraída de la misma donde se seleccionaron los datos de los 776 sujetos seleccionados para el presente estudio. Los análisis estadísticos se han realizado mediante el programa estadístico SPSS (versión 19.0).

Para la descripción de las variables se emplearon la media aritmética, la desviación estándar, el mínimo, el máximo, frecuencias y porcentajes.

Mediante el test Kolmogorov-Smirnov se comprobó el ajuste o no a una distribución normal de cada variable.

Para la comparación de medias se aplicaron:

- En los casos en que la variable se distribuyera de manera normal: ANOVA para muestras independientes (además de las correspondientes pruebas post-hoc: Tukey y Games Howell).
- En los casos en los que la variable no se distribuyera de manera normal: prueba de Kruskal-Wallis, además de las correspondientes comparaciones por pares, empleando la prueba U de Mann-Whitney.

Para analizar la posible influencia del sexo en las variables estudiadas se ha aplicado:

- En los casos en que la variable se distribuyera de manera normal: prueba T de Student para muestras independientes.
- En los casos en los que la variable no se distribuyera de manera normal: prueba no paramétrica U de Mann Whitney, acompañada de la corrección de Bonferroni, para controlar la tasa de error.

Para analizar la correlación entre las diferentes variables y la edad del sujeto, se realizó un gráfico de dispersión y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

Para aceptar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los diferentes análisis se ha tomado un intervalo de confianza al 95% ($p= 0.05$).

2.5.2. ANÁLISIS DE VARIABLES GENÉTICAS

2.5.2.1. Control de calidad

Los datos genéticos fueron sometidos a un procedimiento de control de calidad estándar en los estudios de asociación, en función de la desviación del equilibrio Hardy Weinberg y la tasa de genotipado.

- Tasa de genotipado por SNP del 99.5% → Los SNPs debían estar genotipados en el 99.5% de los sujetos para ser considerados en el estudio, si no se eliminaban.
- Equilibrio Hardy Weinberg → El equilibrio Hardy Weinberg en la población se valoró, para cada SNP, como la diferencia entre la distribución observada de genotipos y su distribución esperada en función de las frecuencias génicas. Dicha diferencia se evaluó estadísticamente mediante un test de Chi cuadrado. Los SNPs que no estuvieron en equilibrio (con una probabilidad <0.001 en este caso) fueron eliminados de los análisis posteriores.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa *Plink* y varias bibliotecas de R para Windows (*librarySNPassoc*, *skatMeta*).

2.5.2.2. Análisis de SNPs individuales

Para el análisis individual, para cada una de las variantes, las diferencias en frecuencia de genotipos en casos y controles fueron

evaluadas mediante regresión logística, empleando el programa *Plink*. Las variables género y edad fueron incluidas como covariables en el modelo de regresión. El análisis fue realizado asumiendo el modelo genético aditivo. En dicho modelo, los genotipos son codificados como 0, 1 ó 2 en función del número de copias del alelo menos frecuente.

Para controlar las múltiples comparaciones realizadas (por SNPs), se ha aplicado la corrección *False Discovery Rate* (FDR-BH) (Benjamini Y. y Hochberg Y., 1995), de tal manera que una probabilidad ajustada por FDR (valor q) ≤ 0.05 se consideró significativa.

De los 295988 SNP, eliminando monomórficos, es decir, aquellos que se encontraban en genes con la misma secuencia y el mismo locus y, por tanto, no varían en la población de estudio (una gran mayoría en población española) y tras los filtros aplicados, quedó un total de 41828 SNPs para este estudio.

2.5.2.3. Análisis por gen

El análisis por gen fue realizado mediante el test SKAT (*Sequence Kernel Association Test*), empleando la librería *skatMeta* de R. SKAT es una de las muchas pruebas propuestas para valorar el efecto combinado de las variantes de un gen. La idea es resumir en una puntuación la presencia de SNPs o variantes en un mismo gen, ponderando en función de unos pesos, generalmente relacionados con la frecuencia. Puede usarse para analizar exclusivamente las variantes raras (filtrando los SNPs en función de la frecuencia) o el efecto conjunto de éstas y las comunes, que es como se ha hecho en este caso.

De los 41828 SNPs que teníamos para el análisis individual, en el análisis por gen se seleccionaron aquellos genes que presentaban por lo menos dos de ellos, quedando un total de 8139 genes.

2.5.2.4. Análisis por vía de señalización

Para el análisis por vía de señalización, partimos de una selección de vías de señalización (117 en total), extraídas tres bases de datos diferentes:

- KEGG: 42 vías de señalización, de 10 a 328 genes cada una (en total, 3485 genes).
- Biocarta: 24 vías de señalización, de 9 a 39 genes cada una (en total, 517 genes).
- Reactome: 51 vías de señalización, de 10 a 538 genes cada una (total 3071 genes).

A continuación, se seleccionaron los SNPs genotipados en el *Axiom Exome array* de Affymetrix que pertenecen a los genes de estas vías de señalización. Esto permite hacer el análisis por vía de señalización, agrupando la totalidad de SNPs de los diferentes genes de cada vía.

Este análisis fue realizado empleando el mismo programa que en el análisis individual, *Plink*, el cual está implementado con un tipo de análisis en grupos (SETs) que se puede aplicar a este tipo de análisis:

- Se definen los SETs (SNPs de una vía de señalización, en este caso)
- Se mira cuantos SNPs de cada SET son significativos a nivel individual con el test que se haya definido (en nuestro caso regresión logística)

usando sexo y edad como covariables) por debajo de un umbral (normalmente $p < 0.05$)

- Se seleccionan SNPs independientes
- Se calcula el promedio del estadístico para los SNPs que pasan los filtros anteriores
- Para calcular una significación asociada a ese estadístico se realizaron 5000 permutaciones de casos y controles resultando una probabilidad empírica como el número de veces que se obtiene para ese SET un valor del estadístico menor al observado

2.6. TRATAMIENTO BIBLIOGRÁFICO

Respecto al tratamiento de la documentación bibliográfica, se ha hecho en base a los requisitos exigidos a los artículos científicos enviados a revistas biomédicas para su aceptación y posterior publicación recogidos en las normas de la asociación americana de psicología (Normas APA).

3. RESULTADOS

3.1. PERFIL DE LA MUESTRA

La muestra incluyó un total de 776 sujetos del ETES, 423 clasificados como no frágiles (55%), 288 como prefrágiles (37%) y 65 como frágiles (8%).

3.1.1. Sexo

La muestra total constó de 320 hombres (41%) y 456 mujeres (59%). El grupo de no frágiles estuvo formado por 179 hombres (42%) y 244 mujeres (58%), el grupo de prefrágiles por 120 hombres (42%) y 168 mujeres (58%) y el grupo de frágiles por 21 hombres (32%) y 44 mujeres (68%), tal y como se muestra en la siguiente figura.

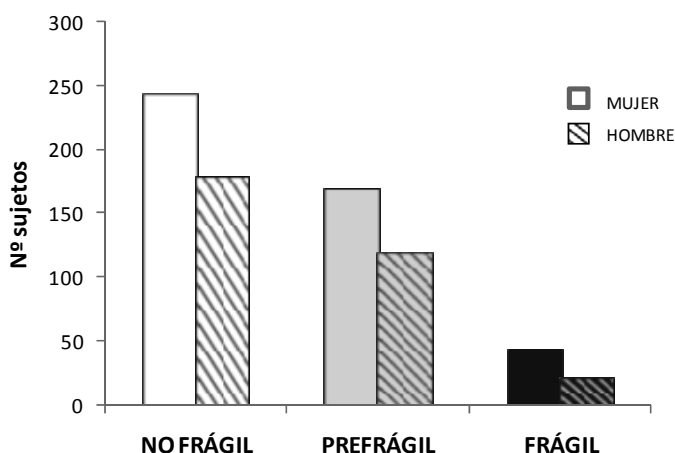


Figura 3.1. Distribución por grupos según el sexo de la muestra. La n total fue de 776 sujetos: 423 no frágiles, 288 prefrágiles y 65 frágiles.

3.1.2. Edad

La media de edad de la muestra fue de 73.46 (\pm 4.91) años. La edad de los individuos frágiles fue significativamente mayor que la de los prefrágiles ($p < 0.01$) y que la de los no frágiles ($p < 0.01$). La media de edad, así como la edad mínima, edad máxima y desviación estándar se especifican en la siguiente tabla:

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Media	DE
No frágil	423	65	98	72.42	4.19
Prefrágil	288	65	88	73.8	4.76
Frágil	65	67	95	78.75	6.24

Tabla 3.1. Edad media de la muestra (por grupos). La n indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar

3.1.3. Índice de masa corporal (IMC)

El IMC medio fue de 29.57 (\pm 5.01). No existieron diferencias estadísticamente significativas en el IMC entre individuos no frágiles, prefrágiles y frágiles. El IMC medio por grupo, así como el IMC mínimo, el máximo y la desviación típica se especifican en la siguiente tabla:

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Media	DE
No frágil	423	17.91	41.44	29.59	5.01
Prefrágil	288	18.09	48.47	29.47	4.93
Frágil	65	20.55	47.06	29.86	5.39

Tabla 3.2. IMC medio de la muestra (por grupos). La n indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar

3.2. ESCALAS DE DEPENDENCIA FUNCIONAL EN NO FRÁGILES, PREFRÁGILES Y FRÁGILES

3.2.1. ÍNDICE DE KATZ

❖ Estadísticos descriptivos

En la Tabla 3.3 se reflejan los estadísticos descriptivos de la variable índice de Katz para cada grupo estudiado (no frágil, prefrágil y frágil).

Grupo	Sexo	N	Mínimo	Máximo	Media	DE
No frágil	Todos	423	4	6	5.98	0.15
	Hombre	179	4	6	5.98	0.16
	Mujer	244	4	6	5.98	0.14
Prefrágil	Todos	288	2	6	5.9	0.39
	Hombre	120	2	6	5.93	0.4
	Mujer	168	2	6	5.88	0.39
Frágil	Todos	65	0	6	4.89	1.58
	Hombre	21	1	6	4.94	1.6
	Mujer	44	0	6	4.86	1.57

Tabla 3.3. Estadísticos descriptivos para la variable índice de Katz, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil). La n indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar

❖ Puntuación índice de Katz en función del grupo

Como hemos señalado en el apartado de material y métodos de la presente tesis, el índice de Katz es una escala que determina el grado de dependencia funcional en las ABVD de un individuo (Katz S. *et al.*, 1963).

Por ello, nos planteamos estudiar la posible existencia de diferencias en la puntuación obtenida en el índice de Katz entre los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil y frágil) y, por tanto, la posible existencia de diferencias en la capacidad funcional para dichas actividades.

Dado que no se cumple la hipótesis de normalidad de esta variable, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, además de las correspondientes comparaciones por pares empleando la prueba U de Mann-Whitney. Además, se aplicó la corrección de Bonferroni, para controlar la tasa de error, estableciéndose el nivel de significación en 0.017.

Como podemos observar en la Figura 3.2, los individuos frágiles obtuvieron una puntuación media significativamente menor que los prefrágiles ($p < 0.01$) y que los no frágiles ($p < 0.01$) en el índice de Katz, lo cual es indicativo de una mayor dependencia funcional. La puntuación media de los individuos prefrágiles también fue significativamente menor que la de los no frágiles ($p < 0.01$).

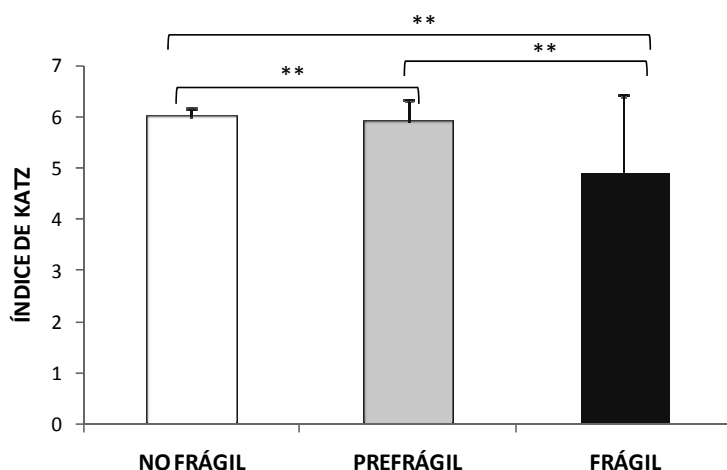


Figura 3.2. Puntuación media obtenida en el índice de Katz en individuos no frágiles ($n=423$), prefrágiles ($n=288$) y frágiles ($n=65$). La significación estadística se expresa como $**=p<0.01$

❖ Puntuación índice de Katz en función del sexo

A continuación, nos planteamos si el sexo podía tener alguna influencia en los resultados obtenidos previamente, es decir, si podía ser el sexo y no la condición de fragilidad lo que determinara la dependencia funcional en las ABVD en nuestra población. Para ello, estudiamos la posible existencia de diferencias en la puntuación media obtenida en el índice de Katz en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil y frágil) en función del sexo, mediante la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, acompañada de la corrección de Bonferroni.

Tal y como podemos observar en la Figura 3.3, no se produjeron diferencias estadísticamente significativas en la puntuación media obtenida en el índice de Katz en ningún grupo estudiado en función del sexo.

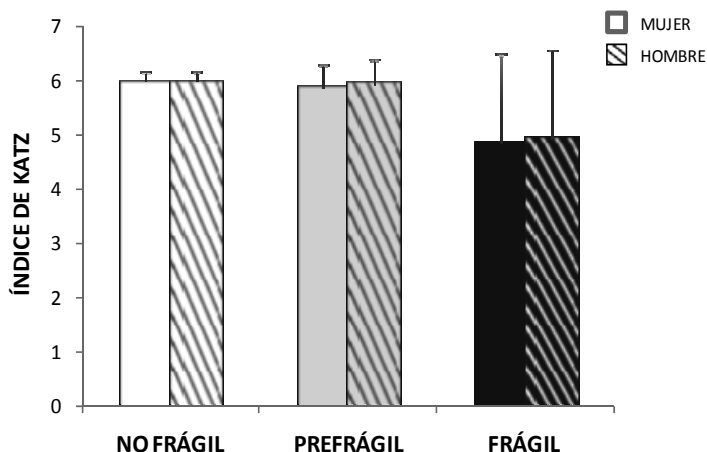


Figura 3.3. Puntuación media obtenida en el índice de Katz en individuos no frágiles ($n=423 \rightarrow 179$ hombres y 244 mujeres), prefrágiles ($n=288 \rightarrow 120$ hombres y 168 mujeres) y frágiles ($n=65 \rightarrow 21$ hombres y 41 mujeres) en función del sexo.

❖ Puntuación índice de Katz en función de la edad

Por último, para determinar la posible correlación entre la puntuación media obtenida en el índice de Katz y la edad de los sujetos (teniendo en cuenta nuestro rango de edad, de 65 a 95 años), se realizó un diagrama de dispersión y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (Figura 3.4).

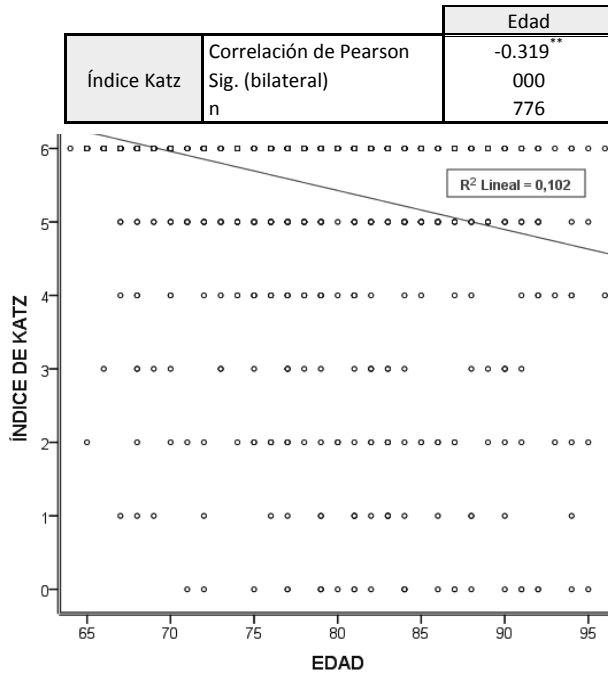


Figura 3.4. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables índice de Katz y edad. La n indica el número total de sujetos y la significación estadística se expresa como $**=p<0.01$

En el diagrama de dispersión mostrado en la Figura 3.4, observamos una relación lineal inversa entre las dos variables estudiadas, índice de Katz y edad del sujeto, de tal manera que cuanta más edad, menor fue la puntuación media obtenida en esta escala. Aunque el coeficiente de Pearson fue estadísticamente significativo, no alcanzó el valor indicativo de buena correlación (0.7) (Dancey C. y Reidy J., 2004), por lo que podemos afirmar que la relación entre la puntuación obtenida en el índice de Katz y la edad del sujeto fue muy débil.

❖ Resumen de los resultados obtenidos en el índice de Katz

Los resultados obtenidos en relación a esta variable muestran cómo la menor puntuación obtenida en el índice de Katz y, por tanto, la dependencia funcional en las ABVD, dependió de la condición de fragilidad y no del sexo ni de la edad del sujeto.

3.2.2. ÍNDICE DE LAWTON Y BRODY

❖ Estadísticos descriptivos

En la Tabla 3.4 se muestran los estadísticos descriptivos de la variable índice de Lawton para los tres grupos estudiados.

Grupo	Sexo	n	Mínimo	Máximo	Media	DE
No frágil	Todos	423	1	8	6.94	1.40
	Hombre	179	1	8	6.09	1.58
	Mujer	244	2	8	7.56	0.83
Prefrágil	Todos	288	0	8	6.04	1.92
	Hombre	120	0	8	5.1	1.84
	Mujer	168	0	8	6.7	1.69
Frágil	Todos	65	0	8	3.78	2.26
	Hombre	21	0	8	2.86	1.66
	Mujer	44	0	8	4.3	2.4

Tabla 3.4. Estadísticos descriptivos para la variable índice de Lawton, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil). La n indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar

❖ Puntuación índice de Lawton en función del grupo

Tal y como hemos explicado con anterioridad, el índice de Lawton es una escala que determina el grado de dependencia funcional en las AIVD (Lawton M.P. y Brody E.M., 1969). Así, estudiamos la posible existencia de diferencias en el promedio de la puntuación obtenida en el índice de Lawton entre los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil y frágil) y, por tanto, la posible existencia de diferencias en la capacidad funcional para dichas actividades.

De este modo, empleando la prueba de Kruskal-Wallis y las correspondientes comparaciones por pares mediante la prueba U de Mann-Whitney, se pudo determinar que los individuos frágiles obtuvieron una puntuación media significativamente menor que los prefrágiles ($p<0.01$) y que los no frágiles ($p<0.01$) en el índice de Lawton, lo cual es indicativo de una mayor dependencia funcional. La puntuación media de los individuos prefrágiles también fue significativamente menor que la de los no frágiles ($p<0.01$).

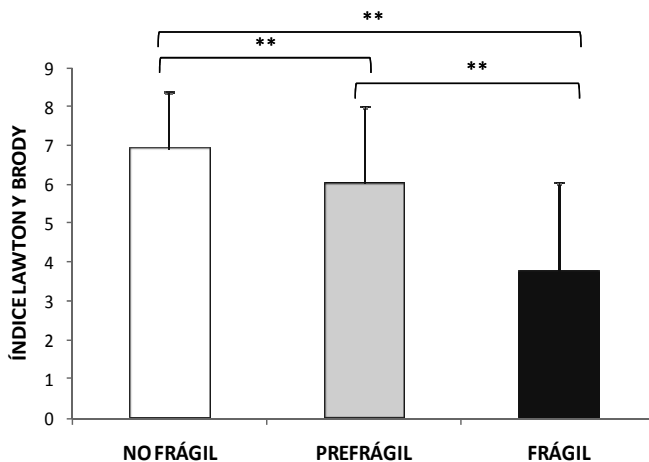


Figura 3.5. Puntuación media obtenida en el índice de Lawton y Brody en individuos no frágiles ($n=423$), prefrágiles ($n=288$) y frágiles ($n=65$). La significación estadística se expresa como $**=p<0.01$

❖ Puntuación índice de Lawton en función del sexo

Como en el caso de la variable anterior, para determinar la existencia de posibles diferencias en la puntuación media obtenida en el índice de Lawton en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil y frágil), en función del sexo del sujeto, se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, acompañada de la corrección de Bonferroni.

Sin embargo, en este caso, los resultados muestran cómo sí existieron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en la puntuación media obtenida en el índice de Lawton en todos los grupos estudiados (Figura 3.6), de tal manera que los hombres puntuaron menos que las mujeres, indicando una mayor dependencia para las AIVD.

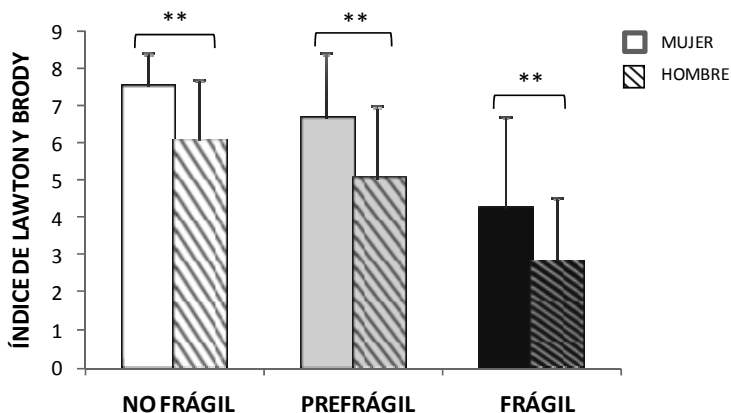


Figura 3.6. Puntuación media obtenida en el índice de Lawton en individuos no frágiles ($n=423 \rightarrow 179$ hombres y 244 mujeres), prefrágiles ($n=288 \rightarrow 120$ hombres y 168 mujeres) y frágiles ($n=65 \rightarrow 21$ hombres y 41 mujeres) en función del sexo. La significación estadística se expresa como $**=p<0.01$

❖ Puntuación índice de Lawton en función de la edad

Para determinar la posible correlación entre la puntuación media obtenida en el índice de Lawton y la edad de los sujetos (teniendo en cuenta nuestro rango de edad de 65 a 95 años), se realizó un diagrama de dispersión y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (Figura 3.7).

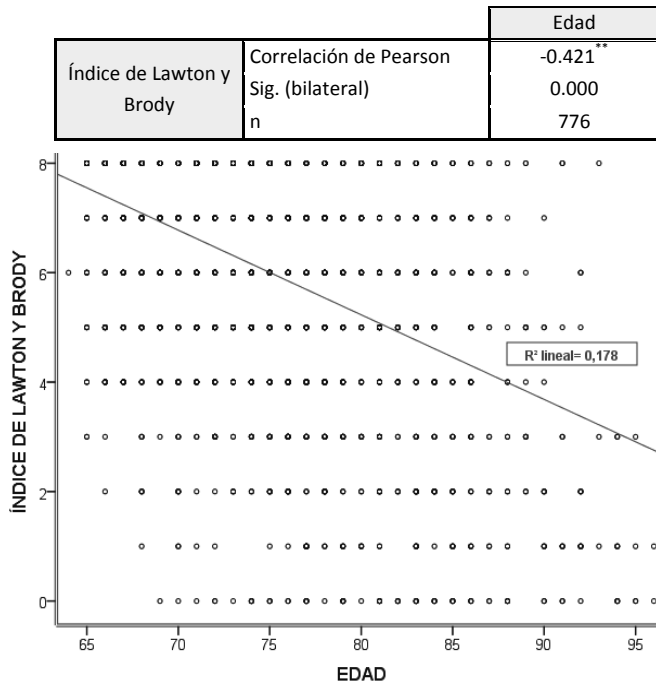


Figura 3.7. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables índice Lawton y Brody y edad. La n indica el número total de sujetos y la significación estadística se expresa como **= $p < 0.01$

En el diagrama de dispersión mostrado en la Figura 3.7 se observa una correlación lineal inversa entre las dos variables estudiadas, índice de Lawton y Brody y edad del sujeto, de forma que cuanta más edad, menor fue la puntuación

media obtenida en esta escala. El coeficiente de correlación fue significativo, pero no alcanzó el valor indicativo de buena correlación (0.7) (Dancey C. y Reidy J., 2004), por lo que podemos afirmar la relación entre ambas variables fue muy débil.

❖ Resumen de los resultados obtenidos en el índice de Lawton

Los resultados obtenidos en relación a esta variable muestran cómo menor puntuación obtenida en el índice de Lawton y, por tanto, la dependencia funcional en las AIVD, dependió de la condición de fragilidad y del sexo masculino, pero no de la edad del sujeto.

3.3. ESCALA DE DETERIORO COGNITIVO EN NO FRÁGILES, PREFRÁGILES Y FRÁGILES

3.3.1. ESCALA MMSE

❖ Estadísticos descriptivos

En la Tabla 3.5 se muestran los estadísticos descriptivos de la variable escala MMSE en no frágiles, prefrágiles y frágiles.

Grupo	Sexo	N	Mínimo	Máximo	Media	DE
No frágil	Todos	423	13	30	25.1	3.99
	Hombre	179	13	30	25.58	3.68
	Mujer	244	14	30	24.79	4.19
Prefrágil	Todos	288	0	30	23.04	5.26
	Hombre	120	0	30	23.56	5.15
	Mujer	168	0	30	22.63	5.32
Frágil	Todos	65	0	30	18.97	6.73
	Hombre	21	0	30	19.24	7.83
	Mujer	44	0	30	18.79	5.9

Tabla 3.5. Estadísticos descriptivos para la variable escala MMSE, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil). La n indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar

❖ Puntuación escala MMSE en función del grupo

Tal y como ha sido explicado en el apartado de material y métodos de la presente tesis, la escala MMSE se emplea para determinar el estado cognitivo del individuo, de tal manera que cuanto mayor es la puntuación, mejor es el estado cognitivo del paciente, y viceversa (Folstein M.F. *et al.*, 1975). Puntuaciones inferiores a 24 sugieren deterioro cognitivo. Con el objetivo de determinar la posible existencia de diferencias en el promedio de la puntuación obtenida en la escala MMSE en función de la condición de fragilidad se aplicaron la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la prueba U de Mann-Whitney y la corrección de Bonferroni.

Atendiendo la Figura 3.8, podemos observar que los individuos frágiles obtuvieron una puntuación media significativamente menor que los prefrágiles ($p < 0.01$) y que los no frágiles ($p < 0.01$) en la escala MMSE, lo cual es indicativo de un peor estado cognitivo. La puntuación media de los individuos prefrágiles

también fue significativamente menor que la de los no frágiles ($p < 0.01$). Además, si atendemos a la Tabla 3.5 podemos observar cómo tanto los individuos prefrágiles como los frágiles obtuvieron puntuaciones medias inferiores a 24, lo cual indicaría que estos pacientes presentaban deterioro cognitivo.

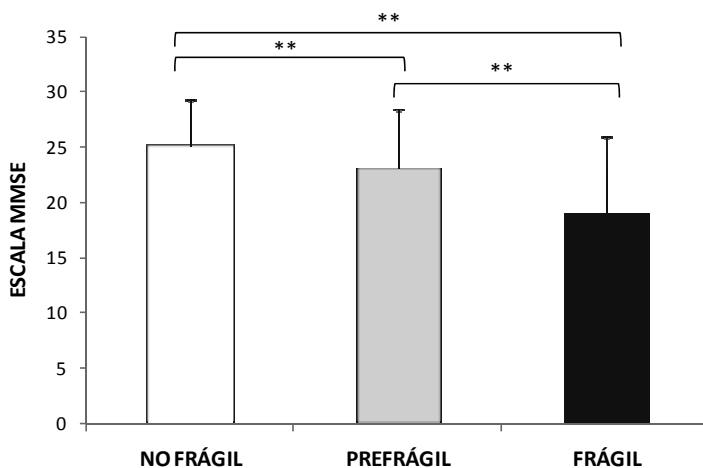


Figura 3.8. Puntuación media obtenida en la escala MMSE en individuos no frágiles ($n=423$), prefrágiles ($n=288$) y frágiles ($n=65$). La significación estadística se expresa como $**=p < 0.01$

❖ Puntuación escala MMSE en función del sexo

Una vez comprobado que existían diferencias en las puntuaciones obtenidas en la escala MMSE en función del grupo, analizamos la posible influencia del sexo en los resultados obtenidos previamente. Para ello, estudiamos la posible existencia de diferencias significativas en la puntuación media obtenida en la escala MMSE en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil y frágil), en función del sexo, mediante la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, acompañada de la corrección de Bonferroni.

En el Figura 3.9 podemos observar cómo no se produjeron diferencias estadísticamente significativas en la puntuación media obtenida en la escala MMSE en ningún grupo estudiado en función del sexo.

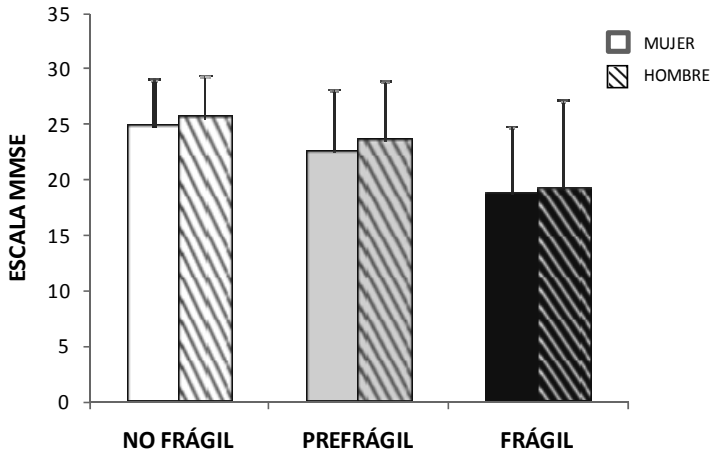


Figura 3.9. Puntuación media obtenida en la escala MMSE en individuos no frágiles ($n=423 \rightarrow 179$ hombres y 244 mujeres), prefrágiles ($n=288 \rightarrow 120$ hombres y 168 mujeres) y frágiles ($n=65 \rightarrow 21$ hombres y 41 mujeres) en función del sexo.

❖ Puntuación escala MMSE en función de la edad

Para determinar la posible correlación entre la puntuación media obtenida en la escala MMSE y la edad de los sujetos (teniendo en cuenta nuestro rango acotado de 30 años), se realizó un diagrama de dispersión y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (Figura 3.10).

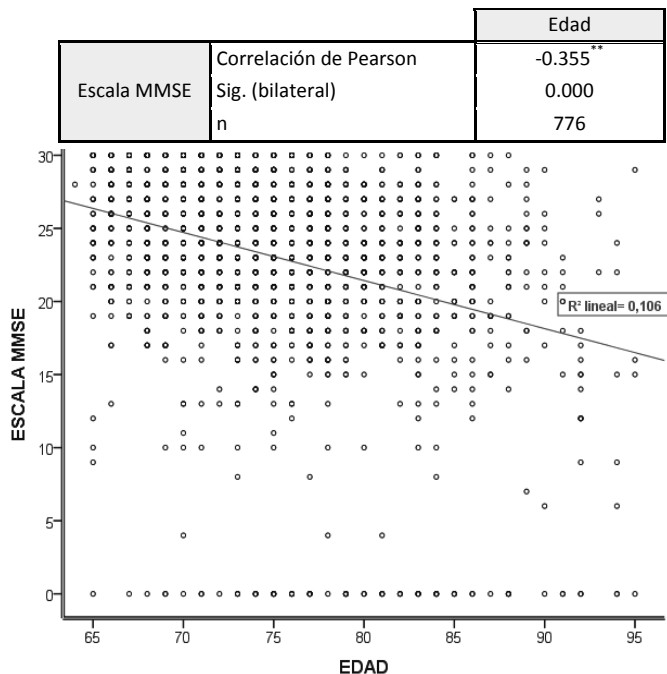


Figura 3.10. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables escala MMSE y edad. La *n* indica el número total de sujetos y la significación estadística se expresa como **= $p < 0.01$

En el diagrama de dispersión mostrado en la Figura 3.10 se observa una correlación lineal inversa entre las dos variables estudiadas, escala MMSE y edad del sujeto, de modo que cuanta más edad, menor fue la puntuación en dicha escala. Aunque el coeficiente de correlación de Pearson fue significativo, dado el bajo valor que adquirió (Dancey C. y Reidy J., 2004), podemos afirmar que no existe una buena correlación entre ambas variables.

❖ Resumen de los resultados obtenidos en la escala MMSE

Los resultados obtenidos en relación a esta variable muestran cómo la menor puntuación obtenida en la escala MMSE y, por tanto, el posible deterioro

cognitivo, dependió de la condición de fragilidad y no del sexo ni de la edad del sujeto.

3.4. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS CON DETERIORO COGNITIVO EN PLASMA EN NO FRÁGILES, PREFRÁGILES Y FRÁGILES

3.4.1. NIVELES DE BDNF EN PLASMA

❖ Estadísticos descriptivos

En la Tabla 3.6 se reflejan los estadísticos descriptivos de la variable niveles de BDNF en plasma para cada grupo estudiado (no frágil, prefrágil y frágil).

Grupo	Sexo	n	Mínimo	Máximo	Media	DE
No frágil	Todos	77	154.49	9460.34	3043.40	2482.59
	Hombre	32	154.49	8197.76	3095.6	2514.7
	Mujer	45	176.12	9460.34	3006.29	2487.34
Prefrágil	Todos	73	55.31	7532.24	2227.47	1729.73
	Hombre	34	76.94	7532.24	2497.1	1865.8
	Mujer	39	55.31	6265	1992.42	1588.73
Frágil	Todos	76	30.65	6695	2031.14	1657.53
	Hombre	25	105.1	6695	2123.67	1832.83
	Mujer	51	30.65	5467.41	1985.78	1581.86

Tabla 3.6. Estadísticos descriptivos para la variable niveles de BDNF en plasma, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil). La n indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar

❖ Niveles de BDNF en plasma en función del grupo

Tal y como ha sido explicado en el introducción de la presente tesis, menores niveles del factor neurotrófico BDNF se han correlacionado con deterioro cognitivo (Laske C. *et al.*, 2006). Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos en la escala clínica MMSE, que mostraban un mayor deterioro cognitivo de los pacientes frágiles y prefrágiles en comparación a los no frágiles, estudiamos la posible existencia de diferencias en los niveles medios de BDNF en plasma entre los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil y frágil). Para ello, se aplicaron la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la prueba U de Mann-Whitney y la corrección de Bonferroni.

Así, tal y como podemos observar en la Figura 3.11, los resultados muestran cómo los individuos frágiles presentaron unos niveles de BDNF en plasma significativamente menores que los no frágiles ($p < 0.017$), apuntando a un mayor deterioro cognitivo de estos pacientes, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la escala MMSE (Figura 3.8).

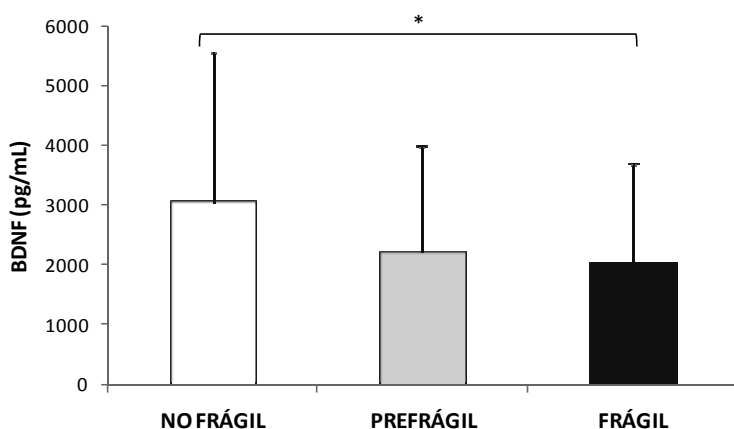


Figura 3.11. Niveles promedio de BDNF en plasma en individuos no frágiles ($n=77$), prefrágiles ($n=73$) y frágiles ($n=76$). La significación estadística se expresa como $*=p < 0.017$

❖ Niveles de BDNF en plasma en función del sexo

Nuevamente para esta variable y con el objetivo de determinar la posible existencia de diferencias significativas en los niveles medios de BDNF en plasma en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil) en función del sexo, se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, acompañada de la corrección de Bonferroni.

En el Figura 3.12 podemos constatar que en ninguno de los grupos estudiados se produjeron diferencias estadísticamente significativas en los niveles promedio de BDNF en plasma en función del sexo.

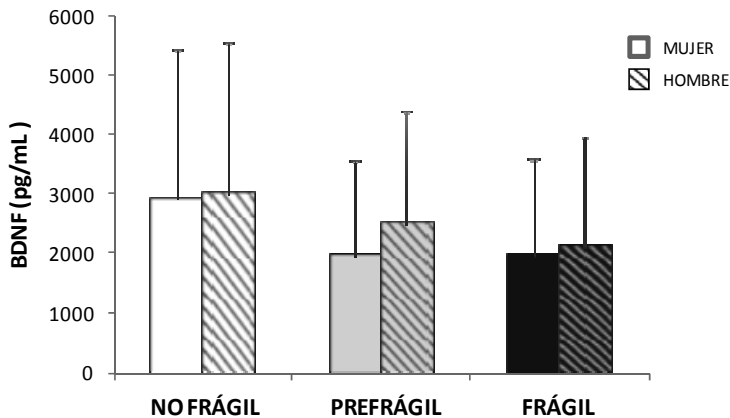


Figura 3.12. Niveles promedio de BDNF en plasma en individuos no frágiles ($n=77 \rightarrow 32$ hombres y 45 mujeres), prefrágiles ($n=73 \rightarrow 34$ hombres y 39 mujeres) y frágiles ($n=76 \rightarrow 25$ hombres y 51 mujeres) en función del sexo.

❖ Niveles de BDNF en plasma en función de la edad

Para determinar la posible correlación entre los niveles medios de BDNF en plasma y la edad de los sujetos (en una población de 65 a 95 años de edad), se

realizó un diagrama de dispersión incluyendo ambas variables y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (Figura 3.13).

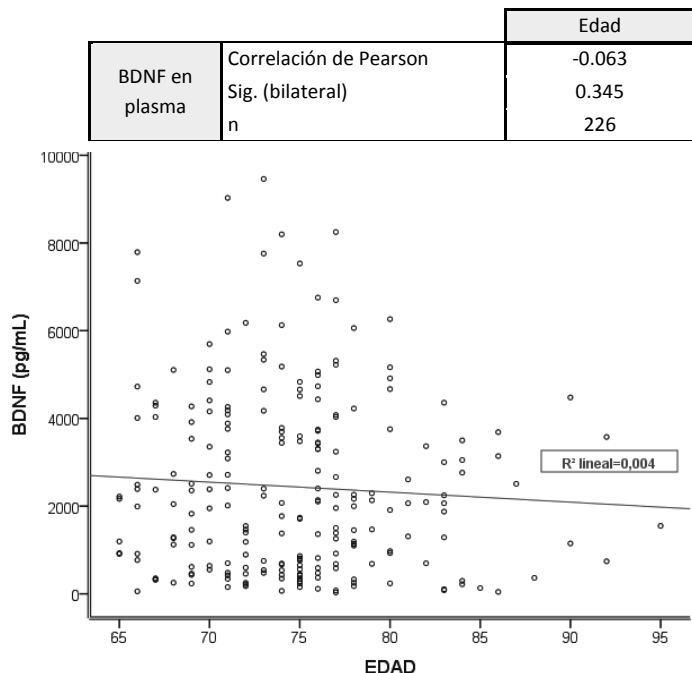


Figura 3.13. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables niveles de BDNF en plasma y edad. La n indica el número total de sujetos

El diagrama de dispersión de la Figura 3.13 muestra que no existió correlación alguna entre niveles de BDNF en plasma y la edad del sujeto.

❖ Resumen de los resultados obtenidos en los niveles de BDNF en plasma

Los resultados obtenidos en relación a esta variable muestran cómo los menores niveles de BDNF en plasma y, por tanto, el posible deterioro cognitivo, dependió de la condición de fragilidad y no del sexo ni de la edad del sujeto.

3.5. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA EN NO FRÁGILES, PREFRÁGILES Y FRÁGILES

3.5.1. NIVELES DE MDA EN PLASMA

❖ Estadísticos descriptivos

En la Tabla 7 se reflejan los estadísticos descriptivos de la variable niveles de MDA en plasma para cada grupo estudiado (no frágil, prefrágil y frágil).

Grupo	Sexo	n	Mínimo	Máximo	Media	DE
No frágil	Todos	423	0	15.13	2.19	2.04
	Hombre	179	0	14.22	2.44	2.3
	Mujer	244	0	15.13	2.01	1.82
Prefrágil	Todos	288	0	17.20	2.66	2.8
	Hombre	120	0	16.46	2.36	2.56
	Mujer	168	0	17.2	2.88	2.95
Frágil	Todos	65	0.05	15.07	3.63	3.10
	Hombre	21	0.64	7.75	3.04	2.28
	Mujer	44	0.05	15.07	3.91	3.41

Tabla 3.7. Estadísticos descriptivos para la variable niveles de MDA en plasma, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil). La n indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar

❖ Niveles de MDA en plasma en función del grupo

Tal y como hemos explicado con anterioridad en la presente tesis, los niveles de MDA en plasma son un producto de la peroxidación lipídica que indica

un daño oxidativo a lípidos (Nielsen F. *et al.*, 1997). Con el objetivo de estudiar la posible existencia de diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MDA en plasma entre los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil y frágil) se aplicaron: la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la prueba U de Mann-Whitney y la corrección de Bonferroni.

La Figura 3.14 muestra cómo los individuos frágiles presentaron niveles de MDA en plasma significativamente mayores que los prefrágiles ($p < 0.01$) y que los no frágiles ($p < 0.01$).

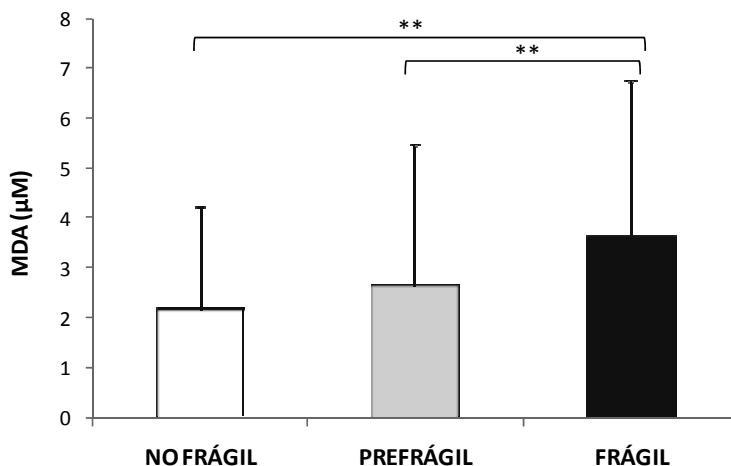


Figura 3.14. Niveles promedio de MDA en plasma en individuos no frágiles ($n=423$), prefrágiles ($n=288$) y frágiles ($n=65$). La significación estadística se expresa como $**=p < 0.01$

❖ Niveles de MDA en plasma en función del sexo

Estudios previos de nuestro laboratorio sugieren que las mujeres presentan menores niveles de daño oxidativo que los hombres debido al papel protector que ejercen los estrógenos (Borras C. *et al.*, 2003). Para estudiar las

posibles diferencias significativas en los niveles medios de MDA en plasma en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil y frágil), en función del sexo del sujeto, se empleó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, acompañada de la corrección de Bonferroni.

En la Figura 3.15 podemos observar que no existieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles medios de MDA en plasma en ninguno de los grupos estudiados (no frágiles, prefrágiles, frágiles), en función del sexo.

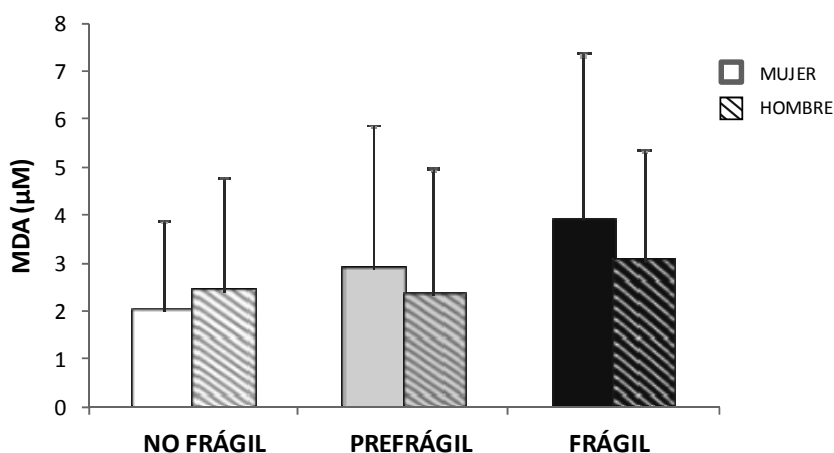


Figura 3.15. Niveles promedio de MDA en plasma en individuos no frágiles ($n=423 \rightarrow 179$ hombres y 244 mujeres), prefrágiles ($n=288 \rightarrow 120$ hombres y 168 mujeres) y frágiles ($n=65 \rightarrow 21$ hombres y 41 mujeres) en función del sexo.

❖ Niveles de MDA en plasma en función de la edad

Tal y como hemos comentado en el apartado introducción de la presente tesis, existe una gran evidencia científica de cómo el estrés oxidativo aumenta con la edad de los individuos (Sohal R.S., 1993; Harman D., 2001). Por ello, con el objetivo de determinar la posible influencia de la edad en los resultados

Resultados

obtenidos, estudiamos la posible correlación entre los niveles medios de MDA en plasma y la edad de los sujetos (teniendo en cuenta nuestro rango acotado de edad). Para ello, se realizó un diagrama de dispersión incluyendo ambas variables y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (Figura 3.16).

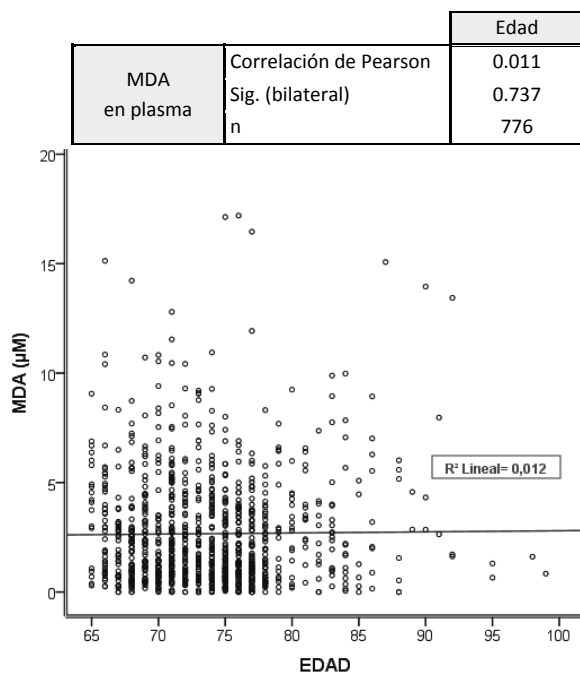


Figura 3.16. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables niveles de MDA en plasma y edad. La n indica el número total de sujetos.

Tal y como podemos observar en la Figura 3.16, no existió correlación significativa entre los niveles de MDA en plasma y la edad del sujeto.

❖ Resumen de los resultados obtenidos en los niveles de MDA en plasma

Los resultados obtenidos en relación a esta variable muestran cómo los mayores niveles de MDA en plasma, por tanto, el mayor daño oxidativo a lípidos, dependió de la condición de fragilidad y no del sexo ni de la edad del sujeto.

3.5.2. NIVELES DE PROTEÍNAS OXIDADAS EN PLASMA

❖ Estadísticos descriptivos

En la Tabla 3.8 se reflejan los estadísticos descriptivos de la variable proteínas oxidadas en plasma para cada grupo estudiado (no frágil, prefrágil y frágil).

Grupo	Sexo	n	Mínimo	Máximo	Media	DE
No frágil	Todos	53	24.49	99.19	64.36	12.50
	Hombre	22	41.46	99.19	65.68	13.79
	Mujer	31	24.49	95.93	63.43	14.79
Prefrágil	Todos	53	42.67	100	75.01	15.5
	Hombre	24	53.43	100	75.76	15.35
	Mujer	29	42.67	100	74.38	15.88
Frágil	Todos	50	50.41	100	77.6	15.6
	Hombre	17	51.33	100	74.06	12.58
	Mujer	33	50.41	100	79.43	16.83

Tabla 3.8. Estadísticos descriptivos para la variable proteínas oxidadas en plasma, en los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil). La n indica el número de sujetos por grupo y la DE la desviación estándar

❖ Niveles de proteínas oxidadas en plasma en función del grupo

Tal y como hemos comentado con anterioridad en la presente tesis, los niveles de proteínas oxidadas son un buen marcador de daño oxidativo a proteínas (Dalle-Donne I. *et al.*, 2003) Por ello, con el fin de estudiar la posible existencia de diferencias significativas en los niveles de proteínas oxidadas en plasma entre los diferentes grupos estudiados (no frágiles, prefrágiles y frágiles) se realizó la prueba paramétrica análisis de varianza (ANOVA) entre-sujetos, y se aplicó la prueba post-hoc de Tukey, dada la igualdad de varianzas observada en la prueba de Levene.

En la Figura 3.17 podemos observar cómo tanto los individuos frágiles como los prefrágiles presentaron mayores niveles de proteínas oxidadas en plasma que los no frágiles ($p < 0.01$)

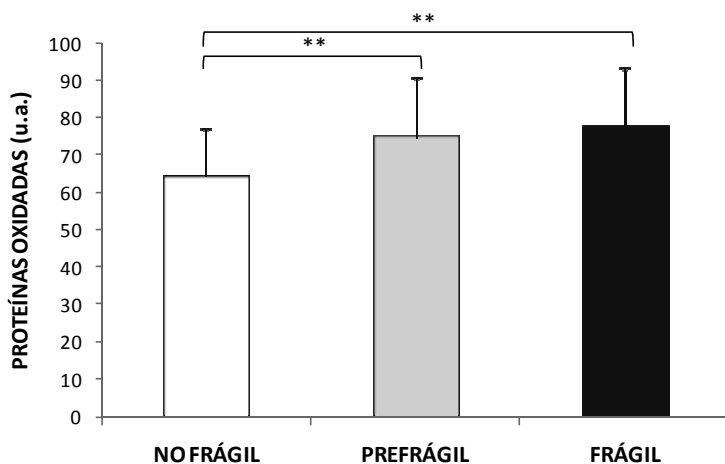


Figura 3.17. Niveles promedio de proteínas oxidadas en plasma en individuos no frágiles ($n=53$), prefrágiles ($n=53$) y frágiles ($n=50$). La significación estadística se expresa como $**=p < 0.01$

❖ Niveles de proteínas oxidadas en plasma en función del sexo

Por el mismo motivo que en el caso de la variable MDA, con la finalidad de determinar la posible existencia de diferencias significativas en los niveles medios de proteínas oxidadas en plasma entre los diferentes grupos estudiados (no frágil, prefrágil, frágil), en función del sexo, se aplicó la prueba T de Student para muestras independientes.

En la Figura 3.18 podemos observar que no existieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles medios de proteínas oxidadas en plasma en los diferentes grupos estudiados (no frágiles, prefrágiles, frágiles), en función del sexo.

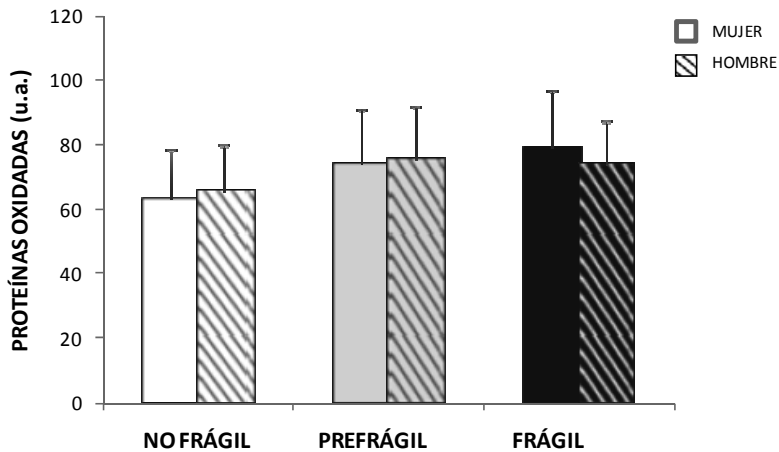


Figura 3.18. Niveles promedio de proteínas oxidadas en plasma en individuos no frágiles ($n=53 \rightarrow 22$ hombres y 31 mujeres), prefrágiles ($n=53 \rightarrow 24$ hombres y 29 mujeres) y frágiles ($n=50 \rightarrow 17$ hombres y 33 mujeres) en función del sexo

❖ Niveles de proteínas oxidadas en plasma en función de la edad

Por el mismo motivo que en el caso del MDA, para determinar la posible correlación entre los niveles medios de proteínas oxidadas en plasma y la edad de los sujetos (en una población de 65 a 95 años de edad), se realizó un diagrama de dispersión incluyendo ambas variables y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (Figura 3.19).

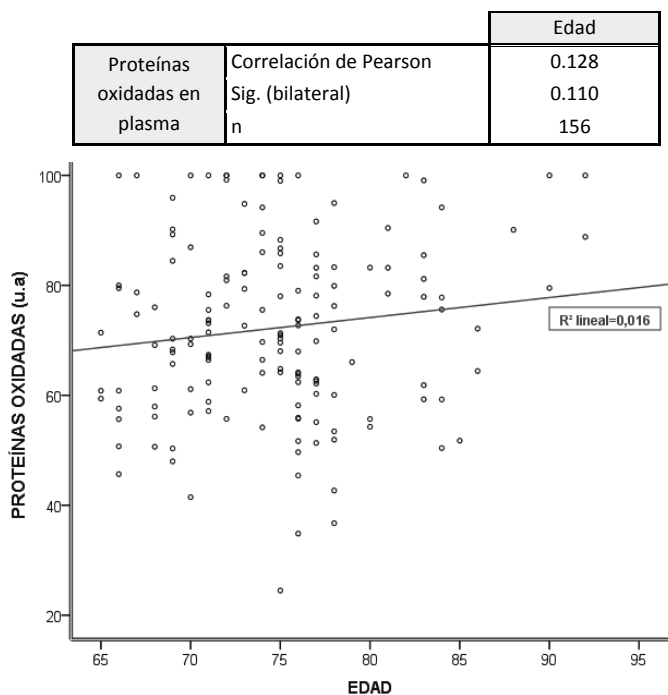


Figura 3.19. Correlación de Pearson y gráfico de dispersión para las variables niveles de proteínas oxidadas y edad. La n indica el número total de sujetos

En la Figura 3.19 se muestra la ausencia de correlación significativa entre los niveles de proteínas oxidadas en plasma y la edad del sujeto.

❖ Resumen de los resultados obtenidos en los niveles de proteínas oxidadas en plasma

Los resultados obtenidos en relación a esta variable muestran cómo los mayores niveles de proteínas oxidadas en plasma y, por tanto, el mayor daño oxidativo a proteínas, dependió de la condición de fragilidad y no del sexo ni de la edad del sujeto.

3.6. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPs) EN FRÁGILES Y NO FRÁGILES

3.6.1. EVALUACIÓN GENERAL

La asociación de SNPs con fenotipos característicos de enfermedades o síndromes tiene un gran potencial para la aplicación clínica, proporcionando nuevos y más precisos marcadores genéticos que sirvan para el diagnóstico, pronóstico e incluso como posibles nuevas dianas terapéuticas (Suh Y. y Vijg J., 2005).

Para el estudio de SNPs relacionados con la fragilidad, contamos con 78 frágiles (casos) y 74 no frágiles (controles). De los 295988 SNPs genotipados en el *array*, se eliminaron 242394 SNPs por ser monomórficos, es decir, se encontraban en genes con la misma secuencia y el mismo locus y, por tanto, no variaban en la población de estudio (una gran mayoría en población española). A continuación, fueron eliminados 11766 SNPs por no superar el control de calidad:

- Tasa de genotipado por SNP del 99.5% → Los SNPs debían estar genotipados en el 99.5% de los sujetos para ser considerados en el estudio, si no se eliminaban.
- Equilibrio Hardy Weinberg → El equilibrio Hardy Weinberg en la población se valoró, para cada SNP, como la diferencia entre la distribución observada de genotipos y su distribución esperada en función de las frecuencias génicas. Dicha diferencia se evaluó estadísticamente mediante un test de Chi cuadrado. Los SNPs que no estuvieron en equilibrio (con una probabilidad <0.001 en este caso) fueron eliminados de los análisis posteriores.

Tras estos filtros, quedaron un total de 41828 SNPs, tal y como se muestra en la Figura 3.20, con los cuales se realizaron tres tipos de análisis:

- Individual → en el que se determinaron SNPs relacionados con la fragilidad
- Por gen → en el que se determinaron genes relacionados con la fragilidad, basándose en la presencia de, por los menos, dos SNPs.
- Por vía de señalización → en el que se estudiaron aquellas relacionadas con la fragilidad, de entre 117 preseleccionadas.

En los siguientes apartados se detallan los resultados obtenidos en cada uno de los tres análisis.

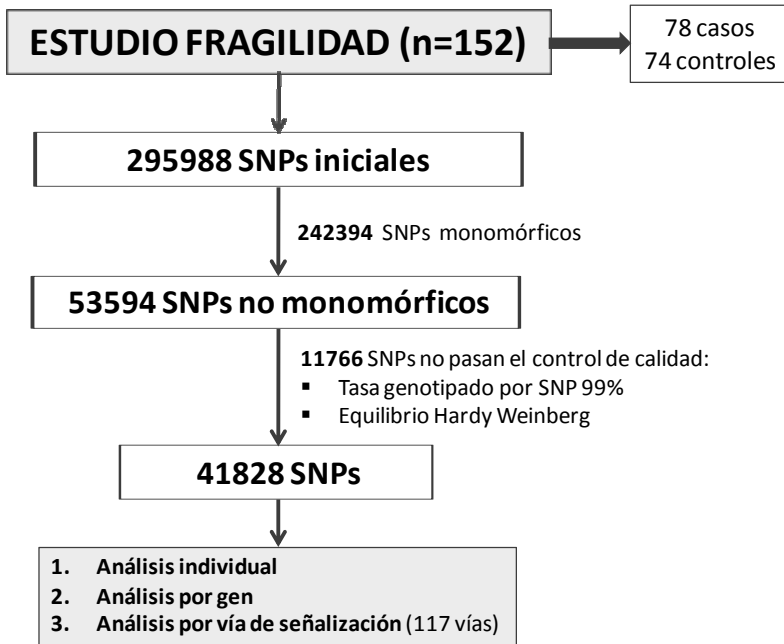


Figura 3.20. Esquema del proceso de triple análisis de SNPs

3.6.2. ANÁLISIS INDIVIDUAL: SNPs RELACIONADOS CON LA FRAGILIDAD

De los 41828 SNPs que pasaron los controles de calidad mencionados en el anterior apartado, 105 mostraron un p valor inferior a 0.005, y 15 de ellos obtuvieron un p valor menor a 0.001 (Tabla 3.9).

Resultados

SNP	Gen	Cromosoma	Odd Ratio	P
rs11812479	No se sabe	10	3.149	0.000038
rs10457204	FIG4	6	3.345	0.000049
rs737154	SLC12A7	5	2.618	0.000222
rs16889283	AARD	8	2.832	0.000251
rs3773603	CACNA2D3	3	0.233	0.000297
rs3809430	FSCB	14	2.760	0.000386
rs7096031	OTUD1	10	2.923	0.000409
rs4148883	ADH4	4	0.409	0.000429
rs11208257	PGM1	1	3.359	0.000607
rs613444	NFIB	9	0.394	0.000702
rs1929860	CDC42BPA	1	2.514	0.000764
rs11006229	SGMS1	10	0.329	0.000780
rs1126671	ADH4	4	2.412	0.000832
rs1126673	ADH4	4	2.412	0.000832
rs1387144	BDNF-AS	11	2.704	0.000879

Tabla 3.9. SNPs asociados a la fragilidad ($p < 0.001$), obtenidos mediante el software Plink, analizando variantes raras y comunes con el modelo aditivo. La significación se establece en $0.05/41828 = 0.0000012$

Tal y como podemos observar en la tabla anterior, 11 de los SNPs tuvieron una mayor prevalencia en casos que en controles (odd ratio > 1), por tanto podrían considerarse de riesgo, mientras que los 4 restantes fueron más prevalentes en controles que en casos (odd ratio < 1), por lo cual podrían considerarse protectores.

Dentro de ellos, destacamos los SNPs localizados en genes que participan en procesos relacionados con la fragilidad:

- Metabolismo energético → Encontramos un SNP de riesgo en el gen FIG 4 (*Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate 5-phosphatase*), una fosfatasa sensible a la insulina.

- Regulación de procesos biológicos→ Encontramos un SNP protector en el gen *CACNA2D3* (*Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3*), un canal de calcio voltaje dependiente que regula numerosos procesos biológicos.
- Sistema músculo-esquelético→ Destaca el SNP de riesgo presente en el gen *CDC42BPA* (*CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)*), una quinasa que actúa por debajo de CDC42 en los procesos de reorganización del citoesqueleto de la actina, sobretodo en la formación de actina periférica. Otros SNPs se encuentran en genes que, aunque no están implicados en una función específica de este sistema, regulan procesos celulares clave del mismo, y se expresan en el músculo esquelético, como los SNPs de riesgo en *FIG4*, *SLC12A7* (*Solute Carrier Family 12 (Potassium/Chloride Transporters), Member 7*) y en *PGM 1* (*Phosphoglucomutase 1*) o el SNP protector en *CACNA2D3*.
- Cognición→ Destaca el SNP de riesgo presente en el gen *BDNF-AS* (*BDNF antisense RNA (non-protein coding)*), un transcrito antisentido cuya inhibición o degradación aumenta la expresión de BDNF. También hemos encontrado un SNP protector en el gen *SGMS1* (*Sphingomyelin synthase 1*), un esfingolípidido que forma parte, especialmente, de la vaina de mielina de los axones neuronales.

Por otro lado, tal y como hemos comentado en el apartado de introducción de la presente tesis, los SNPs pueden recaer en regiones intrónicas, las cuales no codifican a proteínas, o regiones exónicas codificantes. A su vez, cuando un SNP se localiza en una región exónica o codificante, puede constituir

un SNP sinónimo, cuando el cambio nucleotídico resulta en un codón que codifica al mismo aminoácido, o un SNP no sinónimo, cuando dicho codón no codifica al mismo aminoácido. Así, en el Anexo 9, se muestra cómo 3 de ellos se encontraron en regiones intrónicas, 8 en regiones exónicas (siendo 3 de ellos sinónimos y 5 no sinónimos), 1 en un UTR, y 3 de ellos se desconoce. En el mismo anexo se especifican las principales características de cada SNP, como el gen al que pertenecen, cromosoma y función.

3.6.3. ANÁLISIS POR GEN: GENES RELACIONADOS CON LA FRAGILIDAD

Para el estudio de genes relacionados con la fragilidad se seleccionaron aquellos que presentaban por lo menos dos SNPs significativos e independientes, quedando un total de 8139 genes. Aunque ninguno llegó a pasar la corrección múltiple ($0.05/8139=0.0000061$), en la Tabla 3.10 se muestran aquellos que obtuvieron un p valor inferior a 0.005.

Gen	nº SNPs	P
TMEM245	3	0.0005
ADH4	3	0.0006
TEX38	2	0.0013
FREM2	10	0.0013
RAD51AP2	7	0.0016
MBIP	2	0.0017
SH3GL3	2	0.0019
SNX14	2	0.0019
CALU	2	0.0020
IVL	2	0.0026
REV1	2	0.0031
ATXN2	2	0.0033
GPR1	2	0.0035
PGLYRP3	2	0.0042
LMBR1	3	0.0044
RP1L1	15	0.0045
CAPN11	3	0.0049
PAX5	2	0.0049

Tabla 3.10. Genes asociados a la fragilidad en el estudio de SNPs ($p < 0.005$) mediante el test SKAT, empleando la librería skatMeta de R. La significación se establece en $0.05/8139 = 0.0000061$

Tal y como hemos hecho en el apartado anterior, a continuación se especifican los genes más relevantes en la fragilidad, en función de los procesos biológicos implicados en la misma:

- Cognición → Destaca el gen TMEM245 (*Transmembrane protein 245*), que codifica a una proteína transmembrana asociada con la velocidad de procesamiento de la información y que presentó 3 SNPs. También encontramos el gen SH3GL3 (*SH3-domain GRB2-like 3*), con 2 SNPs, el cual codifica a una proteína que pertenece a la familia de proteínas endofilinas, y que interviene en la transducción de señales de los receptores de membrana y en la regulación de vesículas sinápticas en el

SNC. Otro gen es el ATXN2 (*Ataxin 2*), que presentó 2 SNPs, cuyas mutaciones pueden ser causa de Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 y Esclerosis Lateral Amiotrófica, ambas enfermedades neurodegenerativas con alteraciones cognitivas. Además, encontramos el gen PAX 5 (*Paired box 5*), con 2 SNPs, que codifica a un factor de transcripción que interviene en el desarrollo del SNC, entre otras funciones.

- Mecanismos de respuesta al estrés → Destaca, con 2 SNPs, el gen MBIP (*MAP3K12 binding inhibitory protein 1*), que codifica a una proteína que inhibe a la quinasa MAP3K12, induciendo la vía de señalización de *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) en respuesta a distintos estímulos de estrés y produciendo diferentes respuestas fisiológicas de defensa.
- Sistema inmune y antiinflamatorio → Dentro de este grupo encontramos el gen PGLYRP3 (*Peptidoglycan recognition protein 3*), con 2 SNPs, que presenta un papel bactericida frente a determinadas bacterias patógenas y no patógenas, GRAM (+) y GRAM (-). Además, tiene un papel antiinflamatorio en las células epiteliales intestinales, donde disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias inducidas por proteoglicanos bacterianos.

3.6.4. ANÁLISIS POR VÍA DE SEÑALIZACIÓN: VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RELACIONADAS CON LA FRAGILIDAD

Tal y como hemos comentado en el apartado material y métodos de la presente tesis, para el análisis por vías de señalización, se seleccionaron 117 vías a partir de tres bases de datos diferentes:

- KEGG: 42 vías de señalización, de 10 a 328 genes cada una (en total, 3485 genes).
- Biocarta: 24 vías de señalización, de 9 a 39 genes cada una (en total, 517 genes).
- Reactome: 51 vías de señalización, de 10 a 538 genes cada una (total 3071 genes).

Del mismo modo, se seleccionaron los SNPs genotipados en el “*Axiom Exome array*” de Affymetrix que pertenecían a los genes de estas vías de señalización. Esto permitió hacer el análisis, agrupando la totalidad de SNPs de los diferentes genes de cada vía de señalización.

En la Tabla 3.11 se muestran las vías de señalización relacionadas con la fragilidad. Tal y como podemos observar en dicha tabla, 7 vías de señalización obtuvieron un p valor < 0.05 , aunque ninguna de ellas llegó a ser estadísticamente significativa, por no pasar la corrección de Bonferroni.

Resultados

Vía de señalización	NºSNP	NºSIG	IND	EMP1	Rs	Gen
Metabolismo almidón y sacarosa	94	2	1	0.0020	rs11208257	PGM1
Vía de las pentosas fosfato	31	2	1	0.0040	rs11208257	PGM1
Vía intrínseca de la apoptosis	28	1	1	0.0070	rs78800940	PMAIP1
Metabolismo fármacos cit p450	139	6	3	0.0144	rs1126671	ADH4
					rs7260329	CYP2B6
					rs1693482	ADH1C
Metabolismo xenobióticos cit p450	136	6	3	0.0156	rs1126671	ADH4
					rs7260329	CYP2B6
					rs1693482	ADH1C
Glucólisis, gluconeogénesis	93	9	5	0.0382	rs11208257	PGM1
					rs1126671	ADH4
					rs1693482	ADH1C
					rs6050249	ACSS1
					rs6741892	GALM
Regulación citoesqueleto de la actina	310	6	5	0.0464	rs442856	FGFR4
					rs7168069	ITGA11
					rs11895564	ITGA6
					rs2084385	PAK2
					rs2306022	ITGA11

Tabla 3.11. Vías de señalización asociadas a la fragilidad en el estudio de SNPs ($p < 0.05$), obtenidas mediante el software PLINK. NºSNP= Número de SNPs presentes en la vía de señalización, NºSIG= Número de SNPs significativos, IND= Número de SNPs significativos e independientes (eliminando los excesivamente ligados), EMP1=Valor empírico igual al número de veces que se obtiene para ese SNP un valor menor al observado, dividido entre 5000 permutaciones. La significación se establece en $0.05/117=0.00043$

Tal y como hemos comentado en el apartado de introducción de la presente tesis, la fragilidad se ha relacionado con biomarcadores relacionados con el sistema metabólico, músculo-esquelético, estando involucrada la apoptosis en este último. Por ello, de las vías mostradas en la tabla anterior, vamos a destacar por su relevancia en la presente tesis, las siguientes:

- **Vía de las pentosas fosfato**→ Dentro de esta vía, encontramos un SNP significativo e independiente en el gen PGM1 (*Phosphoglucomutase 1*).
- **Vía intrínseca de la apoptosis**→ Dentro de esta vía, encontramos un SNP significativo e independiente en el gen PMAIP1 (*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* ó *NOXA*).
- **Glucólisis, gluconeogénesis**→ Dentro de estas vías, encontramos 5 SNPs en total, uno en cada uno de los siguientes genes: PGM1 (*Phosphoglucomutase 1*), ADH4 (*Alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide*), ADH1C (*Alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide*), ACSS1 (*Acyl-CoA synthetase short-chain family member 1*) y GALM (*Galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)*).
- **Regulación del citoesqueleto de la actina**→ Dentro de esta vía, encontramos 5 SNPs: uno en el gen FGFR4 (*Fibroblast growth factor receptor 4*), dos en el gen ITGA11 (*Integrin, alpha 11*), uno en el gen ITGA6 (*Integrin, alpha 6*) y el último en el gen PAK2 (*p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2*).

3.7. RESUMEN DE RESULTADOS DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS

3.7.1. DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE GRUPOS

A continuación se muestra una tabla resumen con los resultados de cada variable entre los diferentes grupos estudiados.

	NO FRÁGIL- PREFRÁGIL	NO FRÁGIL- FRÁGIL	PREFRÁGIL- FRÁGIL
ÍNDICE DE KATZ	SÍ (**)	SÍ (**)	SÍ (**)
ÍNDICE LAWTON	SÍ (**)	SÍ (**)	SÍ (**)
ESCALA MMSE	SÍ (**)	SÍ (**)	SÍ (**)
BDNF	NO	SÍ (**)	NO
MDA	NO	SÍ (**)	SI (**)
PROTEÍNAS OXIDADAS	SÍ (**)	SÍ (**)	NO
SNPs		NO	

Tabla 3.12. Resumen de las diferencias entre grupos de las diferentes variables estudiadas. La significación estadística se expresa como $=p<0.05$ y $**=p<0.01$*

3.7.2. DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN FUNCIÓN DEL SEXO Y LA EDAD

La siguiente tabla resume la relación de cada variable con los factores sexo y edad del sujeto.

	SEXO	EDAD
ÍNDICE DE KATZ	NO	SÍ, LEVE (-0,319 ^{**})
ÍNDICE LAWTON	SÍ, EN TODOS	SÍ, LEVE (-0,421 ^{**})
ESCALA MMSE	NO	SÍ, LEVE (-0,355 ^{**})
BDNF	NO	NO (-0,063)
MDA	NO	NO (0,011)
PROTEÍNAS OXIDADAS	NO	NO (0,128)

Tabla 3.13. Resumen de la relación entre las diferentes variables estudiadas y el sexo y la edad del sujeto. La significación estadística se expresa como $*=p<0.05$ y $**=p<0.01$

4. *DISCUSIÓN*

4.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Los resultados de la presente tesis muestran cómo la fragilidad se relaciona con una mayor dificultad para la realización de las actividades de la vida diaria (tanto aquellas consideradas como básicas, como las instrumentales), con un mayor deterioro cognitivo, con unos menores niveles de BDNF en plasma, con un mayor daño oxidativo a lípidos y a proteínas y, por último, con la presencia de polimorfismos genéticos. A su vez, observamos que estas relaciones son independientes del sexo y de la edad del sujeto, a excepción de la relación entre fragilidad y dependencia para las AIVD, que es mayor en hombres.

La fragilidad fue evaluada mediante los criterios propuestos por Fried y colaboradores (Fried L.P. *et al.*, 2001), de acuerdo con numerosos estudios longitudinales, tanto nacionales como internacionales (Ble A. *et al.*, 2006; Avila-Funes J.A. *et al.*, 2009; Ottenbacher K.J. *et al.*, 2009; Szanton S.L. *et al.*, 2009; Abizanda P. *et al.*, 2011).

Dado que se trata de estudiar una entidad geriátrica, la edad mínima de la muestra se estableció en 65 años, coincidiendo con la mayoría de estudios sobre fragilidad consultados (Rockwood K. *et al.*, 1999; Fried L.P. *et al.*, 2001; Ble A. *et al.*, 2006; Avila-Funes J.A. *et al.*, 2009; Ottenbacher K.J. *et al.*, 2009; Beasley J.M. *et al.*, 2010). En cuanto a la edad máxima, ésta fue de 95 años. En los estudios podemos observar cómo ésta varía entre los 79 años (Szanton S.L. *et al.*, 2009; Beasley J.M. *et al.*, 2010) y los 101 del CHS (Fried L.P. *et al.*, 2001).

Por otro lado, tal y como hemos comentado en el apartado de introducción de la presente tesis, no existe consenso en cuanto a la prevalencia

de fragilidad, debido a la falta de acuerdo en cuanto a la definición y los criterios empleados para su valoración (Collard R.M. *et al.*, 2012; Shamlivan T. *et al.*, 2013). Cuando se tienen en cuenta sólo aquellos estudios en los cuales se han empleado los criterios de Fried utilizados en la presente tesis, la prevalencia oscila entre el 4 y el 17% (Collard R.M. *et al.*, 2012). Por tanto, la obtenida en nuestro estudio, que fue del 8%, entraría en dicho rango.

4.2. FRAGILIDAD Y DEPENDENCIA FUNCIONAL

La fragilidad es un síndrome geriátrico considerado como un “*continuum*” que se inicia con una disminución de la reserva homeostática del organismo, la cual a su vez provoca un inicio de deterioro funcional. Si este deterioro progresa, puede llevar al individuo a una situación de vulnerabilidad y, en última instancia, a la dependencia. De este modo, diversos autores han propuesto tradicionalmente la dependencia para las actividades de la vida diaria, tanto básicas como, sobre todo, instrumentales, como indicadores del riesgo de padecer fragilidad y, por tanto, como marcadores de la misma (Rockwood K. *et al.*, 1999; Nourhashemi F. *et al.*, 2001). No obstante, la tendencia actual es pensar que son indicadores de fragilidad tardíos, puesto que cuando aparece el deterioro funcional, podría considerarse que la discapacidad ya ha comenzado, por lo que no serían buenos marcadores y se evita su evaluación en el cribado de los pacientes frágiles (Abizanda P. *et al.*, 2010; García-García F. *et al.*, 2011). Sea como marcador o como característica común, en lo que sí están de acuerdo la mayoría de los autores es que, tal y como indican nuestros resultados, los individuos frágiles muestran mayores dificultades para las actividades de la vida diaria que los no frágiles (Fried L.P. *et al.*, 2001; Ottenbacher K.J. *et al.*, 2009; Szanton S.L. *et al.*,

2009; Abizanda P. *et al.*, 2011; P Abizanda J.L.-T., L Romero, M López, P M Sánchez, P Atienzar, 2011).

Como escalas de valoración, hemos empleado la escala de Katz para las ABVD y la escala de Lawton para las AIVD , coincidiendo con el “*Hispanic Established Populations for Epidemiologic Study of the Elderly (HEPESE)*” (Ottenbacher K.J. *et al.*, 2009) y el estudio de “Fragilidad y dependencia en Albacete (FRADEA)” (Abizanda P. *et al.*, 2011), respectivamente. El estudio sobre fragilidad en Lérida de Jürschik también emplea estas dos escalas (Jurschik Gimenez P. *et al.*, 2011). Otras escalas utilizadas son el índice de Barthel para las ABVD (Abizanda P. *et al.*, 2011) y la “*Older Americans Resource Scale for Instrumental Activities of Daily Living (OARS-IADL)*” para las AIVD (Ottenbacher K.J. *et al.*, 2009).

La relación entre la dificultad para las AIVD medida mediante el índice de Lawton y el sexo del sujeto ha sido motivo de controversia, ya que se sugiere que esta escala tiene un marcado carácter cultural, debido a que los ítems que contempla son, en su mayoría, actividades relacionadas con el cuidado del hogar y que esto, por tanto, podría producir un sesgo en los resultados, ya que tradicionalmente es la mujer la que se ha dedicado a estos quehaceres (Martín-Lesende I. *et al.*, 2006). Ello podría explicar las diferencias que encontramos en nuestros resultados, donde los hombres muestran mayores dificultades para la realización de las AIVD que las mujeres en todos los grupos (no frágiles, prefrágiles y frágiles).

Por otro lado, tanto el índice de Katz como la escala de Lawton se han considerado como escalas geriátricas, por lo que es lógico pensar que la edad es un factor determinante en los resultados que se obtengan en las mismas. Sin

embargo, nuestros resultados muestran una correlación muy débil entre ambas escalas y la edad del sujeto, lo cual podría explicarse por el rango acotado de edad, de 65 a 95 años, de tal manera que si comparásemos los resultados con un grupo control de menor edad, la correlación debería ser más evidente.

4.3. FRAGILIDAD Y DETERIORO COGNITIVO

La posible relación entre fragilidad y deterioro cognitivo ha sido ampliamente estudiada, existiendo dos grupos claramente diferenciados: aquellos que no establecen dicha relación y sólo contemplan criterios funcionales y nutricionales para valorar la fragilidad (Walston J. y Fried L.P., 1999; Fried L.P. *et al.*, 2001) y aquellos que proponen que debería contemplarse, además de estos criterios, el deterioro cognitivo, con Rockwood a la cabeza (Rockwood K. *et al.*, 2005; Avila-Funes J.A. *et al.*, 2009). A la luz de los resultados obtenidos en nuestro estudio, estamos de acuerdo con la segunda corriente de autores, ya que los individuos frágiles muestran puntuaciones menores en el MMSE, lo cual parece indicar que el deterioro cognitivo juega un papel importante en la fragilidad y que, por tanto, debería considerarse como criterio para detectar la misma.

Por otro lado, Ávila-Funes y colaboradores demostraron recientemente que, de los cinco criterios de fragilidad propuestos por Linda Fried, junto con deterioro cognitivo, que ellos añaden, era este último junto con el bajo nivel de actividad física los factores que más contribuían al deterioro funcional en las ABVD y en las AIVD de los pacientes frágiles (Avila-Funes J.A. *et al.*, 2009). Por tanto, estamos de acuerdo con este autor ya que, en nuestra muestra, los pacientes frágiles presentan un mayor deterioro cognitivo y, además, mayores dificultades para las ABVD y las AIVD.

En cuanto a la metodología empleada para la determinación clínica del deterioro cognitivo, se ha utilizado la escala MMSE coincidiendo con numerosos estudios sobre fragilidad (Rockwood K. *et al.*, 1999; Fried L.P. *et al.*, 2001; Ble A. *et al.*, 2006; Avila-Funes J.A. *et al.*, 2009; Ottenbacher K.J. *et al.*, 2009; Abizanda P. *et al.*, 2011).

La relación entre fragilidad, deterioro cognitivo, e inactividad física (García-García F. *et al.*, 2011), sugiere que podría existir una base biológica común que explicara dicha relación, de manera que ésta no fuera meramente casual, existiendo algún marcador de deterioro cognitivo e inactividad física que fuera detectable en los individuos frágiles. Tal y como hemos comentado en el apartado introducción de la presente tesis, el BDNF reúne estos requisitos y, en efecto, los resultados obtenidos parece que confirman esta teoría, mostrando un descenso de los niveles plasmáticos de este parámetro a medida que aumenta la condición de fragilidad, siendo significativas las diferencias entre frágiles y no frágiles. Estos resultados concuerdan, en parte, con los publicados recientemente por Coelho y colaboradores, los cuales comprobaron cómo las mujeres prefrágiles presentaban menores niveles de BDNF que las no frágiles (Coelho F.M. *et al.*, 2011). Aunque estos autores no incluyeron a mujeres frágiles en su estudio y nosotros no hemos obtenido diferencias significativas entre prefrágiles y no frágiles, sino una tendencia, de los dos estudios se desprende la misma conclusión: la condición de fragilidad lleva consigo un descenso de los niveles de este biomarcador. Estos autores, a su vez, corroboraron la hipótesis de que un protocolo de ejercicio físico en mujeres podía aumentar los niveles de BDNF. Recientemente, Vaughan y colaboradores han llevado a cabo un estudio con mujeres de edades comprendidas entre los 65 y 75 años, en el cual, no sólo han confirmado que un protocolo de ejercicio físico (en este caso multimodal) sea capaz de aumentar los

niveles de BDNF, sino también de mejorar los resultados obtenidos en pruebas físicas y neurocognitivas (Vaughan S. *et al.*, 2014). Por tanto, nuestro estudio es el primero, hasta la fecha, que estudia los niveles de BDNF en individuos pertenecientes a los tres grupos (no frágiles, prefrágiles y frágiles), y que además incluye tanto hombres como mujeres.

En cuanto a la metodología empleada para determinar los niveles de BDNF, estos fueron analizados en plasma, puesto que, tal y como hemos mencionado en el apartado introducción de la presente tesis, reflejan los niveles de este marcador en cerebro (Klein A.B. *et al.*, 2011), coincidiendo con los estudios de Coelho y Vaugham, en los cuales también se emplea la técnica ELISA para su determinación (Coelho F.M. *et al.*, 2011; Vaughan S. *et al.*, 2014)

Nuestros resultados apuntan a la ausencia de relación entre los niveles de BDNF y el sexo. Esto difiere de otros estudios, como el de Lommatzsch (Lommatzsch M. *et al.*, 2005), en el que las mujeres muestran menores niveles de BDNF que los hombres. Este y otros estudios postulan, a su vez la relación de este marcador, medido tanto en suero como en plasma, con la edad, de tal manera que esta condicionaría un descenso en los niveles de BDNF (Lommatzsch M. *et al.*, 2005; Katoh-Semba R. *et al.*, 2007). En este sentido, es interesante destacar que en nuestro laboratorio hemos visto cómo el ejercicio espontáneo durante toda la vida es capaz de prevenir o retrasar este descenso en los niveles de BDNF con la edad en ratones (Garcia-Valles R. *et al.*, 2013). Sin embargo, nuestros resultados no confirman esta relación con la edad, lo cual, una vez más, podría explicarse por la ausencia de grupo control de menor edad.

4.4. FRAGILIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO

La teoría de los radicales libres en el envejecimiento postula que una acumulación progresiva e irreversible de daño oxidativo, causado por las especies reactivas de oxígeno, es capaz de contribuir al deterioro de las funciones fisiológicas asociado al envejecimiento (Harman D., 1956). De esta manera, la relación entre estrés oxidativo y envejecimiento ha sido, tal y como hemos comentado en el apartado de introducción de la presente tesis, ampliamente estudiada, de tal manera que los sujetos más viejos presentan mayores niveles de daño oxidativo que los jóvenes (Stadman E.R., 1992; Sohal R.S., 1993). Además, se ha estudiado la implicación del daño oxidativo en numerosos procesos fisiopatológicos, tales como el cáncer, la aterosclerosis, la diabetes las enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias (Durackova Z., 2010; Nogueira V. y Hay N., 2013). Dado que la fragilidad es un concepto geriátrico, el cual implica un descenso de las reservas fisiológicas en múltiples sistemas, la implicación del estrés oxidativo en la fragilidad es biológicamente posible.

Entre otros, estudios previos de nuestro laboratorio muestran que las mitocondrias constituyen la principal fuente endógena de especies reactivas de oxígeno (Sastre J. *et al.*, 1996) y además, contribuyen en gran medida al metabolismo celular. En este sentido, es bien conocido que con el envejecimiento tiene lugar un descenso del gasto metabólico basal. Sin embargo, se ha postulado que con la aparición de enfermedades crónicas a edades avanzadas se produce un aumento de dicho gasto metabólico, debido a la gran cantidad de energía necesaria para mantener la homeostasis celular (Ruggiero C. y Ferrucci L., 2006). Dado que la fragilidad está asociada a dificultades para mantener dicha homeostasis y a la presencia de enfermedades crónicas, la gran cantidad de

energía necesaria para hacer frente a dichos procesos podría causar una producción excesiva de radicales libres por parte de la mitocondria (Inglés *et al.*, 2014). Este incremento podría, a su vez, activar la vía de señalización de NFkB, y desencadenar procesos inflamatorios, los cuales han sido también relacionados con la fragilidad (Hubbard R.E. y Woodhouse K.W., 2010).

Los resultados muestran, efectivamente, cómo los individuos frágiles presentan mayores niveles de daño oxidativo a lípidos y a proteínas. Otros estudios también han sugerido que el estrés oxidativo podría estar relacionado con la fragilidad, pero no en una cohorte controlada con un gran número de personas, como la empleada en esta tesis. De esta manera, Wu y colaboradores demostraron mayores niveles de daño oxidativo al DNA en los individuos frágiles comparados con los no frágiles (Wu I.C. *et al.*, 2009). Así mismo, Serviddio y colaboradores encontraron mayores niveles de MDA y del ratio GSSG/GSH en los individuos frágiles, en comparación con los no frágiles (Serviddio G. *et al.*, 2009).

El HPLC para la determinación del MDA ha sido validado en un estudio en que participaron numerosos laboratorios, incluido el nuestro, como un método muy específico y sensible, que permite distinguir entre la concentración de malondialdehído y otros aldehídos que pueden reaccionar con el ácido 2-tiobarbitúrico (Breusing N. *et al.*, 2010). Por este motivo nos decantamos por este parámetro de medida para estudiar la lipoperoxidación en plasma. Otros métodos, especialmente la determinación de TBARS que empleó Serviddio en su estudio de fragilidad, no son específicos, por lo que tienen un menor valor científico para el estudio de la fragilidad.

El estrés oxidativo también modifica la actividad de las proteínas, aumentando su susceptibilidad a la degradación, por lo que la oxidación de

proteínas es una buena medida para determinar el estrés oxidativo sistémico en humanos. La determinación de proteínas oxidadas a través de la cuantificación de grupos carbonilo de las mismas ha sido un método ampliamente empleado como marcador de daño oxidativo a proteínas (Stadman E.R., 1992; Dalle-Donne I. *et al.*, 2003). Por esta razón fue elegido como parámetro de estudio. Es interesante destacar que mayores niveles de proteínas carboniladas se han asociado a una disminución en la fuerza de agarre (Howard C. *et al.*, 2007), la cual a su vez está fuertemente relacionada con la edad, y constituye uno de los criterios de fragilidad. Recientemente se han propuesto los niveles elevados de proteínas carboniladas como un marcador de dependencia severa en las ABVD en hombres y mujeres mayores de 65 años (de Gonzalo-Calvo D. *et al.*, 2012).

Nuestros resultados muestran que el estrés oxidativo no se correlaciona con la edad, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos por otros autores descritos previamente. Esto podría ser debido a las características particulares de la muestra, con edades comprendidas entre los 65 y los 95 años de edad, de tal manera que la ausencia de grupo control de personas de menor edad podría no reflejar con exactitud la implicación del estrés oxidativo en el envejecimiento. Además, tal y como hemos comentado en el apartado de introducción de la presente tesis, la teoría de los radicales libres en el envejecimiento ha sido cuestionada en los últimos años. De hecho, desde nuestro laboratorio se ha propuesto una modificación a la misma, llamada “teoría de la alteración en la señalización celular”. En ella se propone que los radicales libres son causa de envejecimiento sólo si generan un daño que altere el funcionamiento normal de las vías de señalización celular (Viña J. *et al.*, 2013).

En cuanto al sexo, tal y como ha sido publicado en nuestro laboratorio, los estrógenos inducen la expresión de enzimas antioxidantes, como la Mn-SOD y la

GPx, que se comportan como genes de supervivencia y que, por tanto, podrían explicar la mayor longevidad de las hembras frente a los machos en humanos y en otras especies, como los roedores (Borras C. *et al.*, 2003). Si atendemos a las edades avanzadas contempladas en nuestro estudio, podemos deducir que las mujeres, al haber transcurrido más de 10 años desde la menopausia, no cuentan con este papel antioxidante de los estrógenos, lo cual podría explicar la ausencia de diferencias estadísticamente significativas obtenidas en la presente tesis.

Recientemente, hemos publicado cómo tanto los niveles de MDA como de proteínas carboniladas en plasma dependen de la condición de fragilidad, independientemente de otras variables, como el perfil lipídico (HDL, LDL, colesterol total y triglicéridos) y algunas enzimas citosólicas, en el caso del MDA, o las proteínas séricas totales, en el caso de la carbonilación proteica (Inglés *et al.*, 2014).

4.5. FRAGILIDAD Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS

La fragilidad como entidad multisistémica viene determinada por la combinación de factores ambientales, genéticos y epigenéticos, los cuales regulan la expresión genética diferencial en las células y podrían ser especialmente importantes durante el desarrollo de la fragilidad (Clegg A. *et al.*, 2013). Se ha observado que este componente genético juega un papel fundamental en la variabilidad interindividual que condiciona el desarrollo de la fragilidad, con diferencias considerables con respecto al sexo: en los hombres, el estado de fragilidad depende más de dichos factores genéticos, mientras que en mujeres depende más de factores ambientales (Dato S. *et al.*, 2012). Además, se ha podido

observar cómo la influencia del componente genético es mayor a edades avanzadas (Dato S. *et al.*, 2012).

Además, tal y como hemos comentado con anterioridad, la asociación de polimorfismos genéticos con fenotipos característicos de enfermedades o síndromes, en este caso con el fenotipo de fragilidad, tiene un gran potencial para la aplicación clínica, proporcionando nuevos y más precisos marcadores genéticos que podrían ser útiles para el diagnóstico, pronóstico e incluso como posibles nuevas dianas terapéuticas (Suh Y. y Vijg J., 2005). Estos hechos justifican el análisis de variantes genéticas en nuestro estudio.

El análisis de variantes comunes (SNPs) y raras empleado en la presente tesis coincide con las recomendaciones recientes a la hora de estudiar enfermedades complejas, ya que en ellas intervienen numerosos genes e interacciones entre los mismos (Suh Y. y Vijg J., 2005; Gibson G., 2011).

4.5.1. ANÁLISIS INDIVIDUAL

En el análisis individual, encontramos 15 SNPs con un p valor inferior a 0.001, aunque no se consideran estadísticamente significativos tras aplicar la corrección de Bonferroni, lo cual es frecuente en los estudios de asociación, donde se suele hablar de “SNPs relacionados con la fragilidad” (Suh Y. y Vijg J., 2005; Ho Y. y *et al.*, 2011). Además, 8 de ellos se localizan en regiones exónicas codificantes, de los cuales 5 son no sinónimos y 3 sinónimos. Históricamente, la atención se ha centrado en los primeros, dado que existía el dogma de que la estructura (y por tanto la función) de la proteína estaba determinada por su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, desde hace una década, existen

evidencias de que las mutaciones sinónimas son igualmente importantes, puesto que pueden resultar en un corte y emplame (en inglés *splicing*) aberrante del ARN mensajero, así como afectar a su estabilidad, y por tanto a la expresión proteica y actividad enzimática (Sauna Z.E. y Kimchi-Sarfaty C., 2011). Además, desde el 2007 se sabe que los SNPs sinónimos pueden afectar a la conformación de la proteína y tener consecuencias funcionales y clínicas importantes, pudiendo dar lugar al desarrollo de enfermedades (Kimchi-Sarfaty C. *et al.*, 2007). También encontramos 3 SNPs en regiones intrónicas y uno en un UTR, todas ellas constituyen regiones reguladoras funcionalmente importantes que también pueden afectar a la estabilidad del ARN mensajero (Prokunina L. y Alarcon-Riquelme M.E., 2004).

El SNPs más significativo en nuestro estudio (considerado de riesgo, por presentar un odd ratio mayor que 1), se encuentra en el gen FIG4 (*Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate 5-phosphatase*), que codifica a una fosfatasa que reduce los niveles de fosfatidilinositol 3,5-bifosfato (PI(3,5)P2), lo cual se ha relacionado con dificultades para completar el proceso de autofagia (Wood C.S. *et al.*, 2009). Por otro lado, también se ha propuesto como una fosfatasa sensible a la insulina, de tal manera que la disminución de sus niveles produce una mejora en la resistencia a la insulina (Ikonomov O.C. *et al.*, 2009). Este hecho podría estar relacionado con el aumento de la resistencia a la insulina que muestran los pacientes frágiles. Además, mutaciones en este gen se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Charcot Marie Tooth (Lenk G.M. *et al.*, 2011), la esclerosis lateral amiotrófica (Chow C. y. *et al.*, 2009) y el síndrome de Yunis Varon (Campeau P.M. *et al.*, 2013). Todos ellos, tal y como sucede con el síndrome de fragilidad, son procesos

caracterizados por un deterioro funcional progresivo, lo cual podría sugerir una base común subyacente.

Otro de los SNPs relacionado con la fragilidad (en este caso protector, por presentar un odd ratio menor de 1) lo encontramos en el gen CACNA2D3 (*Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3*), el cual codifica a un canal de calcio voltaje dependiente. Como todos los canales de calcio, puede regular numerosos procesos biológicos relacionados con el crecimiento celular en los que interviene el calcio, tales como la proliferación, motilidad, angiogénesis, resistencia a la apoptosis y regulación transcripcional. Todos estos procesos podrían estar alterados en la fragilidad.

Además, algunos de los genes en los cuales hemos encontrado SNPs se han relacionado con procesos tumorales, los cuales están relacionados con la vía de la apoptosis. Esta vía, tal y como hemos visto en los resultados de la presente tesis y discutiremos a continuación, se relaciona con la fragilidad en nuestro estudio. De esta manera, el gen que acabamos de mencionar, el CACNA2D3, se ha propuesto como un supresor tumoral (Hanke S. *et al.*, 2001; Palmieri C. *et al.*, 2012). En cuanto al gen ADH (*Alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide*), los niveles de ADH4 también se han relacionado con un mejor pronóstico ante determinados tipos de cáncer (Wei R.R. *et al.*, 2012). El gen NFIB (*Nuclear factor I/B*) se ha propuesto como un oncogen sobreexpresado en algunos cánceres como el de pulmón, favoreciendo la proliferación y la viabilidad celular (Dooley A.L. *et al.*, 2011). En cuanto al gen SGMS1 (*Sphingomyelin synthase 1*), un aumento en la actividad de la proteína que codifica, la esfingomielina sintasa (SGMS), se ha relacionado con procesos en los que existe aumento de la proliferación celular, por tanto, también podría ser considerado como un oncogen (Burns T.A. *et al.*, 2013). La presencia de estos SNPs en los individuos frágiles podría condicionar una

mejor o peor evolución del proceso tumoral o la respuesta los tratamientos aplicados.

Es interesante destacar la presencia de SNPs en genes relacionados con el sistema músculo-esquelético, que es uno de los sistemas fisiológicos clave en la fragilidad, tales como CDC42BPA (*CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)*), el cual presenta un SNP de riesgo. Este gen codifica a una quinasa que actúa por debajo de CDC42 en los procesos de reorganización del citoesqueleto de la actina, sobretodo en la formación de actina periférica. Otros genes, aunque no están implicados en una función específica de este sistema, regulan procesos celulares clave del mismo, y se expresan en el músculo, como FIG4, SLC12A7 (*Solute Carrier Family 12 (Potassium/Chloride Transporters), Member 7*), CACNA2D3 o PGM 1 (*Phosphoglucomutase 1*).

Además, también encontramos SNPs en genes relacionados con la cognición, cuyo deterioro también se ha mostrado clave en el síndrome de fragilidad. En este sentido, destacamos el SNP protector en el gen BDNF-AS (*BDNF antisense RNA (non-protein coding)*), que codifica a un transcrito antisentido que emplea diversos mecanismos transcripcionales y posttranscripcionales para regular la expresión de BDNF, tanto del mRNA como de la proteína. Así, se ha visto cómo la inhibición o degradación de BDNF-AS aumenta hasta siete veces la expresión de BDNF, aumenta los niveles de proteína, e induce crecimiento y diferenciación neuronal, tanto *in vivo* como *in vitro* (Modarresi F. *et al.*, 2012). Por otro lado, la proteína codificada por el gen SGMS1 (que presenta un SNP protector), sintetiza un esfingolípidido, llamado esfingomielina, que forma parte de la vaina de mielina que rodea a las neuronas. Esta síntesis se produce a través de la transferencia del grupo fosfocolina de la fosfatidilcolina al grupo hidroxilo primario de la ceramida. La reacción es bidireccional en función de los respectivos

niveles de la esfingolípidos y ceramida. De esta manera se consume ceramida (regulador negativo de la proliferación celular) y fosfatidilcolina, y se forma esfingomiélin y diacilglicerol (factor mitogénico), lo cual se ha relacionado con su efecto proliferativo celular (Huitema K. *et al.*, 2004). Además, suprime la apoptosis mediada por BAX (proteína perteneciente a la sub-familia proapoptótica de BCL-2) y la muerte celular en respuesta a estímulos tales como el peróxido de hidrógeno (Tafesse F.G. *et al.*, 2007).

4.5.2. ANÁLISIS POR GEN

En el análisis por gen, dentro de los relacionados con la función cognitiva que puede estar alterada en la fragilidad, destacamos el gen TMEM245 (*Transmembrane protein 245*), que codifica a una proteína transmembrana asociada con la velocidad de procesamiento de la información, una importante función cognitiva (Luciano M. *et al.*, 2011). La presencia de SNPs en este gen se ha relacionado con la presencia de síntomas negativos de la esquizofrenia (Xu C. *et al.*, 2013). Otro gen relacionado con el sistema nervioso central (SNC) es SH3GL3 (*SH3-domain GRB2-like 3*), que codifica a una proteína que pertenece a la familia de las endofilinas, que contienen un dominio SH3. En el SNC se ha sugerido que esta familia juega un papel crucial en la transducción de señales de los receptores de membrana y en la regulación de vesículas sinápticas. Se expresa en cerebro y testículos, y se cree que contribuye a la vulnerabilidad de las células neuronales en la enfermedad de Huntington (Sittler A. *et al.*, 1998). Muy relacionado con el SNC, también encontramos al gen ATXN2 (*Ataxin 2*). La expansión del triplete CAG en la región codificante de este gen produce ataxia espinocerebelosa tipo 2, una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por signos neurológicos tales como: disartria, adiadococinesia, trastornos de sensibilidad, hiporreflexia, demencia y

ataxia (Lu C.S. *et al.*, 2004). También se ha visto que la presencia variaciones génicas en este gen se relacionan con la esclerosis lateral amiotrófica (Elden A.C. *et al.*, 2010). Otro gen importante en este sentido es el PAX 5 (*Paired box 5*), que codifica a un factor de transcripción que interviene en el desarrollo del SNC, entre otras funciones (Adams B. *et al.*, 1992).

La fragilidad se caracteriza por un aumento de la vulnerabilidad ante agresiones externas, por tanto una mayor dificultad para hacer frente al estrés (Fried L.P. *et al.*, 2001). En este sentido, destacamos el gen MBIP (*MAP3K12 binding inhibitory protein 1*), que codifica a una proteína que inhibe a la quinasa MAP3K12, induciendo la vía de señalización de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), en respuesta a distintos estímulos de estrés y produciendo diferentes respuestas fisiológicas de defensa (Fukuyama K. *et al.*, 2000).

Tal y como hemos comentado en el apartado de introducción de la presente tesis, se ha propuesto que la inflamación juega un papel fundamental en el desarrollo de la fragilidad, de tal manera que se ha propuesto diversos biomarcadores relacionados con la misma. En este sentido, destacamos el gen PGLYRP3 (*Peptidoglycan recognition protein 3*), que codifica a una proteína perteneciente a la familia de proteínas N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, las cuales forman parte del sistema inmune y reconocen a los peptidoglicanos, un componente de las paredes celulares bacterianas. De esta manera se ha comprobado su papel bactericida frente a determinadas bacterias patógenas y no patógenas, GRAM (+) y GRAM (-) (Lu X. *et al.*, 2006). Además, en las células epiteliales intestinales, disminuyen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias inducidas por proteoglicanos bacterianos, sugiriendo su papel antiinflamatorio (Zenhom M. *et al.*, 2012).

Por último, también encontramos un gen relacionado con los procesos tumorales, como PAX5, cuyas alteraciones se han relacionado con la aparición de neoplasias (O'Brien P. *et al.*, 2011).

4.5.3. ANÁLISIS POR VÍA DE SEÑALIZACIÓN

Por último, en el análisis por vía de señalización, destacamos las siguientes:

a) Vía de las pentosas fosfato, glucólisis y gluconeogénesis

La vía de las pentosas fosfato es una ruta alternativa a la vía de la glucólisis que produce moléculas de NADPH como equivalentes reductores y pentosas como partes esenciales para la síntesis de nucleótidos.

Una de las funciones del NADPH en la célula es prevenir el estrés oxidativo, ya que reduce el glutatión oxidado a glutatión reducido, el cual permite a la glutatión peroxidasa convertir el peróxido de hidrógeno en agua. Así, se ha visto que la actividad de esta vía se encuentra aumentada en situaciones de estrés oxidativo, que como hemos visto en la presente tesis, se relaciona con la fragilidad (Palmer A.M., 1999). Además, la NADPH oxidasa, una de las principales fuentes endógenas de radicales libres, oxida el NADPH a NADP⁺, por lo que cabría suponer que un aumento en la producción de NADPH por parte de esta vía debería aumentar los niveles de daño oxidativo.

Por otro lado, tal y como hemos comentado con anterioridad, la fragilidad se relaciona con alteraciones en el metabolismo de la glucosa, tales como un aumento de la glicemia en ayunas y 2 horas después de la ingestión oral de 75g de

glucosa, (Walston J. *et al.*, 2002), la obesidad abdominal (Hubbard R.E. *et al.*, 2010) y la resistencia a la insulina (Barzilay J.I. *et al.*, 2007).

Esta alteración del metabolismo de la glucosa justificaría también la relación observada en la presente tesis entre fragilidad y la vía de la glucólisis y gluconeogénesis. La glucólisis es el conjunto de reacciones metabólicas conservadas en casi todos los organismos, que convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato con la producción neta de dos moléculas de ATP (energía) y dos de NADH (poder reductor). La gluconeogénesis es una vía de síntesis de glucosa a partir de precursores diferentes a los carbohidratos. La alteración del funcionamiento normal de estas vías altera a su vez la síntesis celular, lo cual podría favorecer la fragilidad.

b) Vía intrínseca de la apoptosis

La vía intrínseca de la apoptosis funciona en respuesta a diversos tipos de estrés intracelular, incluyendo la retirada del factor de crecimiento, daño al ADN, problemas de acumulación de proteínas desplegadas en el retículo endoplasmático y la estimulación de receptores de muerte. Tras la recepción de dichas señales de estrés, se activan proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL-2 que, posteriormente, interactúan con proteínas anti-apoptóticas también de la familia BCL-2 y las inactivan. Esta interacción conduce a la desestabilización de la membrana mitocondrial y a la liberación de factores pro-apoptóticos, los cuales inducen la cascada proteolítica de las caspasas, la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, produciendo en última instancia la muerte celular.

Una de las características claves de la fragilidad es una disminución de la homeostasis que dificulta al individuo para hacer frente a situaciones de estrés

(Fried L.P. *et al.*, 2001), por lo que la relación de esta vía con la fragilidad es biológicamente posible. En este sentido, Ho y colaboradores observaron cómo, de los 20 SNPs asociados con la fragilidad en el “*Women’s Health and Aging Studies (WHAS) I*” y II, casi todos se encontraban en genes relacionados con la regulación de la apoptosis, biosíntesis y regulación transcripcional, y no con la inflamación o mantenimiento muscular, que era su primera hipótesis (Ho Y. y. *et al.*, 2011). También se ha encontrado una sobreexpresión de genes relacionados con la apoptosis en un modelo de ratón frágil (Walston J. *et al.*, 2008). Sharpless y DePinho, en una revisión sobre el tema, sugieren que los sucesos intrínsecos heredables enlentecen la renovación de las células madre y que la apoptosis podría acelerar la disminución de la capacidad replicativa de las células madre que tiene lugar con el envejecimiento (Sharpless N.E. y DePinho R.A., 2007). Además, sugieren que esto podría ser causa del desarrollo de fragilidad y enfermedades ligadas al envejecimiento.

Por otro lado, uno de los mecanismos moleculares implicado en la pérdida de masa muscular característica de la sarcopenia (factor clave en la fragilidad) es la apoptosis (Leeuwenburgh C. *et al.*, 2005; Marzetti E. y Leeuwenburgh C., 2006). Así, se ha encontrado un aumento de marcadores de apoptosis de la vía intrínseca (Endo G) en sóleo de ratas viejas con atrofia inducida, en comparación con las jóvenes (Leeuwenburgh C. *et al.*, 2005).

c) Regulación del citoesqueleto de la actina

La actina forma parte de una familia de proteínas globulares que forman los microfilamentos, uno de los tres componentes fundamentales del citoesqueleto de las células de los organismos eucariotas (también denominados eucariontes). Existen 6 isoformas de actina estructuralmente relacionadas: 4

actinas musculares (α -esquelética, α -cardíaca, α -vascular y α -entérica), y 2 actinas citoplasmáticas (β -actina y γ -actina) En las fibras musculares, la actina representa el 18-22% del total de su contenido proteico y su interacción con la miosina, en presencia de ATP, es clave para la contracción muscular (Prochniewicz E. *et al.*, 2007).

Dado que la fragilidad se asocia a alteraciones en el sistema músculoesquelético, en concreto a la sarcopenia, es posible que alteraciones en la regulación del citoesqueleto de esta proteína se relacionen con la fragilidad. De hecho, se ha visto como tanto pequeñas como grandes modificaciones en la estructura de la actina pueden afectar a la función muscular (Prochniewicz E. *et al.*, 2004), la cual se ve alterada en la fragilidad.

Además, mutaciones en 5 de las 6 isoformas de la actina se relacionan con alguna enfermedad. A modo de ejemplo, se han descrito 117 mutaciones en el gen que codifica a la α -actina del músculo esquelético (ACTA1) que se han asociado a la aparición de miopatías congénitas (Laing N.G. *et al.*, 2009).

4.6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La principal limitación desde nuestro punto de vista es, tal y como hemos nombrado repetidas veces a lo largo de la discusión de los resultados, la ausencia de un grupo control formado por sujetos jóvenes, para obtener resultados más consistentes en cuanto a la influencia de la edad en las distintas variables estudiadas. Esto no fue contemplado porque el objetivo era estudiar una entidad geriátrica, la fragilidad, por lo que no era imprescindible incluir individuos jóvenes.

Además, debería haberse incluido en la entrevista inicial la valoración de la actividad física realizada por el sujeto a lo largo de la vida, lo cual podría ayudar a la comprensión de su influencia sobre determinadas variables, sobretodo el BDNF.

Otra limitación considerada es la imposibilidad de poder medir otros parámetros de estrés oxidativo en plasma, mencionados en el apartado de introducción del presente trabajo, como puedan ser el ratio GSH/GSSG, los niveles de 8-oxodG, etc., ya que las muestras de plasma extraídas con el anticoagulante EDTA imposibilitan dicho cometido. Además, tampoco contamos con células mononucleares para poder medir expresión de genes antioxidantes, por ejemplo. De esta manera, podríamos determinar los niveles de oxidantes y antioxidantes, y determinar de forma más precisa la relación entre estrés oxidativo y fragilidad.

Además, al ser un estudio descriptivo, en ámbito comunitario, no permite ver el efecto de una intervención sobre la fragilidad, como pudiera ser un protocolo de ejercicio físico.

Por último, aunque somos conscientes de las limitaciones de nuestro estudio, éste nos ha permitido sacar conclusiones interesantes acerca de la existencia de posibles nuevos biomarcadores de fragilidad.

5. CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos en el ETES, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. La dependencia funcional en las ABVD y en las AIVD se asocia a la fragilidad, independientemente del sexo y de la edad del sujeto, en el caso de las ABVD, y de la edad, en el caso de las AIVD.
2. El deterioro cognitivo se asocia a la fragilidad, independientemente del sexo y de la edad del sujeto.
3. Los menores niveles de BDNF en plasma se asocian a la fragilidad, independientemente del sexo y de la edad del sujeto.
4. El daño oxidativo a lípidos y proteínas, en términos de niveles de MDA y de carbonilación proteica en plasma, respectivamente, se asocia a la fragilidad, independientemente del sexo y de la edad del sujeto.
5. La fragilidad se asocia con la presencia de polimorfismos genéticos, genes y vías de señalización implicadas en importantes procesos fisiopatológicos, tales como el sistema músculoesquelético, la función cognitiva, el metabolismo energético, la respuesta al estrés o la apoptosis.

CONCLUSIÓN FINAL: La fragilidad se relaciona con una mayor dependencia funcional y un mayor deterioro cognitivo. Parámetros como BDNF, MDA, proteínas carboniladas y polimorfismos génicos podrían ser considerados como biomarcadores de fragilidad.

***6. SUMMARY OF
RESULTS, DISCUSSION
AND CONCLUSIONS***

6.1. BACKGROUND AND JUSTIFICATION OF THE STUDY

In the last two decades, the proportion of people aged over 60 years is growing faster than any other age group, as a result of both longer life expectancy and declining fertility rates (OMS,2013). As a consequence, the population is growing older and therefore there is an increasing interest in ageing and how to face age-related problems. Most of the research in this area has so far focused on survival and the plausible interventions to increase lifespan. Recently, however, emphasis has shift to preventing disability (healthspan), rather than merely increasing longevity (lifespan) (Garcia-Valles R. *et al.*, 2013). In this context, age-associated frailty has emerged as a geriatric syndrome (Mitnitski A.B. *et al.*, 2002; Ahmed N. *et al.*, 2007; Xue Q.L., 2011), characterized by a decline in physiologic reserve and function across systems, leading to increased vulnerability and low capacity to cope with external stressors (Fried L.P. *et al.*, 2001; Chen X. *et al.*, 2014). Even if there is no consensus on the definition of frailty, it is clear that this condition can lead to increasing disability, institutionalization, and even death (Fried L.P. *et al.*, 2001; Rockwood K. and Mitnitski A., 2007). The most frequently employed criteria of frailty are those defined by Linda Fried and colleagues in 2001: involuntary weight loss, self-reported exhaustion, low physical activity, slowness, and low grip strength (Fried L.P. *et al.*, 2001). However, these criteria are excessively focused on the musculoskeletal system and may overlook any relationship between these pathophysiological changes and the presence of cognitive impairment, the other major source of disability and frailty (Ferrucci L. *et al.*, 2004; Buchman A.S. *et al.*, 2007; Boyle P.A. *et al.*, 2010; Clegg A. *et al.*, 2013).

Summary of results, discussion and conclusions

One of the most important features of frailty, from the medical point of view, is that it refers to a dynamic condition, which means that not all individuals are frail in the same way, and moreover, a frail individual can become non-frail, if frailty is detected and treated at the onset (Abellan van Kan G. *et al.*, 2008). Thus, some interventions aimed at reversing frailty have been proposed, such as physical exercise, nutritional interventions, or the administration of several pharmacological agents. Among them, only physical exercise has shown beneficial effects on frailty and its key components. Therefore, a great deal of attention has been focused on finding good biomarkers to help in the diagnosis of frailty and to prevent adverse outcomes. In this regard, frailty has been linked to some biomarkers, which are listed in Table 6.1

Neuroendocrine System	Immune System	Cardiovascular System	Musculoskeletal System	Metabolism
↓Testosterone	↑CRP	↑ coagulation	Sarcopenia	↑ Glycemia
↓DHEA	↑IL-6	factor VIII		↑ Abdominal
↓ GH-IGF 1	↑TNF α	↑Fibrinogen		Obesity
↑Cortisol		↑D-Dimer		↑ Insulin
		↑ α -1		resistance
		Antitrypsin		↓Cholesterol
				↓Albumin
				↓Vitamin D

Table 6.1. Proposed biomarkers of frailty

Frailty has also been associated with oxidative stress markers, such as 8-oxodG (Wu I.C. *et al.*, 2009), GSSG/GSH ratio, malondialdehyde (MDA), and 4-hydroxy-2,3- nonenal in plasma (Serviddio G. *et al.*, 2009). Recently, it has also been associated to brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin whose functions are related to neuronal survival/proliferation processes,

inflammation and physical activity (Coelho F.M. *et al.*, 2011) Likewise, some genetic variants have been associated with frailty (Ho Y. y. *et al.*, 2011). However, all these associations were not clearly established.

The aim of this doctoral thesis was to ascertain whether frailty is indeed related to functional dependence and cognitive impairment, as well as to provide some reliable biomarkers related to oxidative stress, cognitive status and genetic variation, which may help in the diagnosis and multidisciplinary approach to the frailty syndrome.

For this purpose, a representative sample of 776 people was randomly selected from the Toledo Study for Healthy Aging (TSHA), a longitudinal population-based cohort of 2,488 community dwelling people from Toledo (Spain), aged 65 and over (Garcia-Garcia F.J. *et al.*, 2011). The sample included 423 non frail (244 women and 179 men), 288 prefrail (168 women and 120 men) and 65 frail individuals (44 women and 21 men).

6.2. FRAILTY AND FUNCTIONAL DEPENDENCE

From a functional point of view, many authors have described an association between frailty and difficulties in performing basic activities of daily living (ADL) and instrumental activities of daily living (IADL). Some of them tend to consider dependence in these activities as a good clinical marker of frailty, which is able to predict institutionalization, need of home-care, and risk of mortality (Judge J.O. *et al.*, 1996; Rockwood K. *et al.*, 2005; Kiely D.K. *et al.*, 2009). However, there is an increasing awareness that frailty should be considered as a state of pre-disability. In this regard, disability determinants should not be included, in

either frailty definition or criteria (Whitson H.E. *et al.*, 2007; Abizanda P. *et al.*, 2010).

Due to this controversy, we aimed to determine if frailty was related to ADL and AIDL functional dependence among individuals from our population.

Katz Index is a scale designed to assess ADL dependence. It evaluates 6 basic activities, so that the lowest score (0) may indicate that the patient is completely disabled in these 6 activities, whilst the highest (6) indicates independence in ADL (Katz S. *et al.*, 1963). This scale has been used in previous studies on frailty, like the “Hispanic Established Populations for Epidemiologic Study of the Elderly” (Ottenbacher K.J. *et al.*, 2009).

As shown in Figure 6.1, frail individuals scored less than prefrail ($p < 0.01$) and non frail ($p < 0.01$) in the Katz index, which suggests that frail individuals are more dependent in ADL than the other two groups, according to previous studies on frailty (Fried L.P. *et al.*, 2001; Bandeen-Roche K. *et al.*, 2006; Ottenbacher K.J. *et al.*, 2009; Abizanda P. *et al.*, 2011). Furthermore, prefrail individuals scored less than non frail ($p < 0.01$).

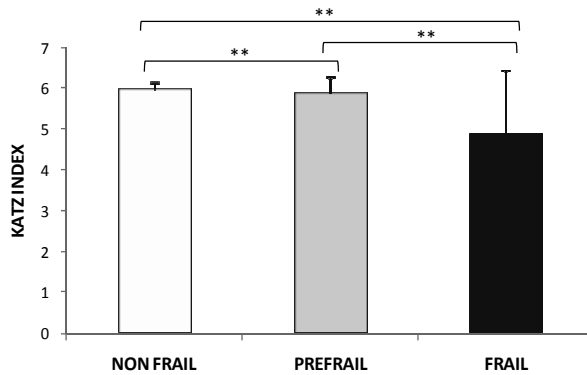


Figure 6.1. Mean score obtained in the Katz index by non-frail ($n = 423$), prefrail ($n = 288$) and frail individuals ($n = 65$). Statistical significance is expressed as $**=p<0.01$

Interestingly, we found no difference between men and women in Katz index score in any group (Figure 6.2), nor a strong correlation (which would be indicated by a minimal Pearson correlation of 0.7 (Dancey C. and Reidy J., 2004), between Katz index score and age (Figure 6.3). These data suggest that the lowest score in the Katz index, and thus functional dependence in ADL, depends on frailty status, rather than gender or age.

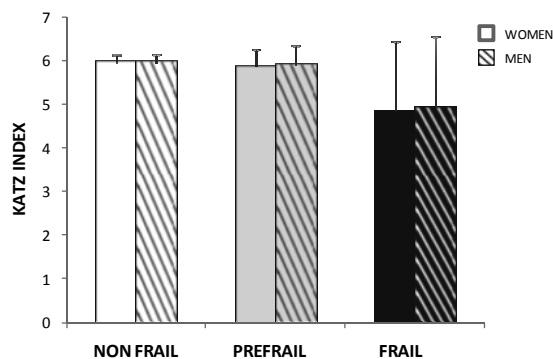


Figure 6.2 Mean score obtained in the Katz index by non-frail ($n=423 \rightarrow 179$ men and 244 women), prefrail ($n=288 \rightarrow 120$ men and 168 women) and frail individuals ($n=65 \rightarrow 21$ men y 41 women) by gender

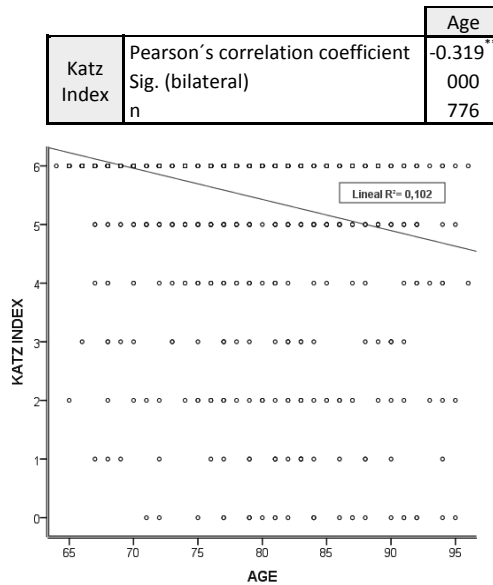


Figure 6.3. Pearson's correlation coefficient and Scatter Plot of Katz Index and age. N indicates the total number of subjects sampled and the statistical significance is expressed as **= $p < 0.01$

Lawton and Brody index is a scale aimed to assess IADL dependence, so that the lowest score (0) may indicate severe functional impairment whereas the highest score (8) suggests maximal independence in this kind of activities (Lawton M.P. and Brody E.M., 1969). Other authors have used this scale when studying frailty-related dependence in AIDL (Jurschik Gimenez P. *et al.*, 2011).

As we can observe in Figure 6.4, frail individuals scored less than prefrail ($p < 0.01$) and nonfrail ($p < 0.01$) in the Lawton and Brody index, which suggests that frail individuals are more dependent in AIDL than prefrail and frail, according to previous studies on frailty (Fried L.P. *et al.*, 2001; Bandeen-Roche K. *et al.*, 2006; Ottenbacher K.J. *et al.*, 2009; Abizanda P. *et al.*, 2011). Hence, as was the case for the Katz index, prefrail individuals scored less than non frail ($p < 0.01$).

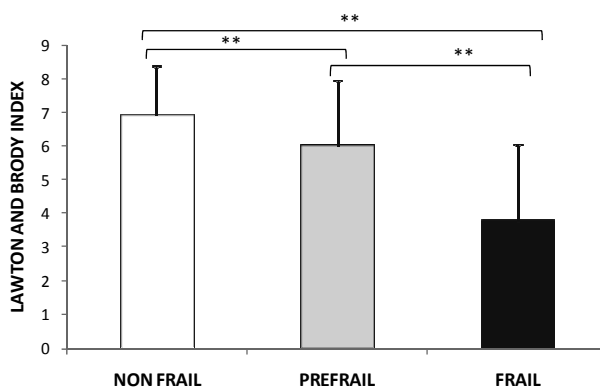


Figure 6.4. Mean score obtained in the Lawton and Brody index by non-frail ($n = 423$), prefrail ($n = 288$) and frail individuals ($n = 65$). Statistical significance is expressed as $**=p<0.01$

In this case, we indeed observed a significant difference between men and women in the mean score obtained in this scale. Men obtained the lowest scores in every group, suggesting that they display more difficulties in performing IADL (Figure 6.5). This gender-based differences in Lawton and Brody index score have been focus of controversy. In this regard, it has been suggested that there is an important cultural influence on this scale, since most of the evaluated activities are based on housework, which have been traditionally performed by women. Indeed, we found that men scored less than women, even in the non-frail group. This, therefore, may produce misleading results. (Martín-Lesende I. *et al.*, 2006), which may explain our results.

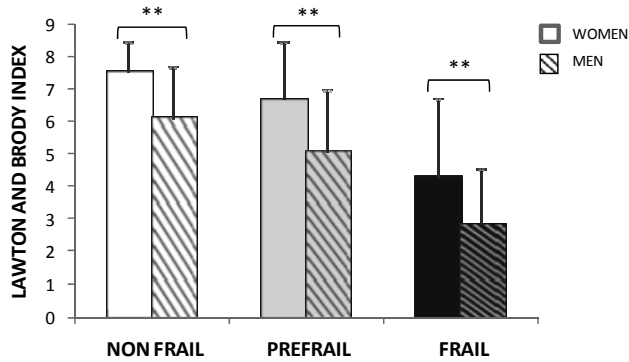


Figure 6.5. Mean score obtained in the Lawton and Brody index by non-frail ($n=423 \rightarrow 179$ men and 244 women), prefrail ($n=288 \rightarrow 120$ men and 168 women) and frail individuals ($n=65 \rightarrow 21$ men y 41 women) by gender. Statistical significance is expressed as $**=p<0.01$

Regarding the potential influence of age on this index score, as it was the case for the Katz Index, we could not find a correlation between Lawton and Brody index score and age (Figure 6.6), which suggests that functional dependence in IADL relies on frailty status and gender, and not on age.

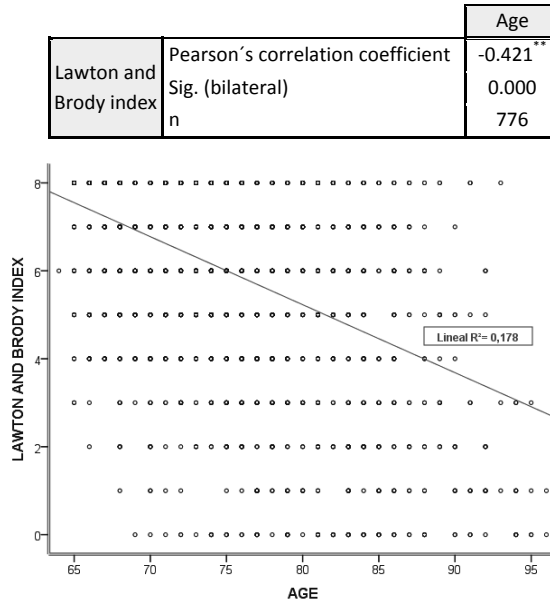


Figure 6.6. Pearson's correlation coefficient and Scatter Plot of Lawton and Brody Index and age. N indicates the total number of subjects sampled and the statistical significance is expressed as **= $p < 0.01$

As both the Katz index and the Lawton and Brody index are geriatric scales, logically age should be a key factor affecting the overall score. The lack of correlation between both scales scores and age could be explained because of the 65 to 95 age range of our sample, so that if we had a younger control group, differences would be expected.

6.3. FRAILTY AND COGNITIVE IMPAIRMENT

The potential relationship between frailty and cognitive impairment has been studied in depth, thus existing two major outlooks on this field: Some authors postulate that cognitive impairment is among the major contributor to

the development of frailty, and should be included on its assessment (Rockwood K. *et al.*, 2005; Avila-Funes J.A. *et al.*, 2009). Other authors do not support this trend, and they just consider functional and nutritional criteria to assess frailty (Walston J. y Fried L.P., 1999; Fried L.P. *et al.*, 2001). Therefore, we aimed to elucidate if cognitive impairment was related to frailty in our Toledo Cohort.

For this purpose, we used the MMSE, a validated test to grade the cognitive status of patients (Folstein M.F. *et al.*, 1975). It evaluates various dimensions of cognition, like orientation, attention, calculation, memory and language, with a maximum total score of 30. Scores under 24 and 10 may indicate mild and severe cognitive impairment, respectively. This test has been used in many studies on frailty (Rockwood K. *et al.*, 1999; Fried L.P. *et al.*, 2001; Ble A. *et al.*, 2006; Avila-Funes J.A. *et al.*, 2009; Ottenbacher K.J. *et al.*, 2009; Abizanda P. *et al.*, 2011).

Figure 6.7 shows that frail individuals scored less than prefrail ($p < 0.01$) and non frail ($p < 0.01$) in the MMSE scale, which may indicate that frail individuals were more cognitively impaired than the other two groups. Furthermore, prefrail individuals obtained less mean score than non frail ($p < 0.01$). This is in agreement with Avila-Funes J.A. *et al.*, who further demonstrated that considering cognitive impairment as the sixth Fried's criteria for frailty, the factors which contribute the most to functional impairment of ADL and AIDL are low physical activity and cognitive impairment (Avila-Funes J.A. *et al.*, 2009).

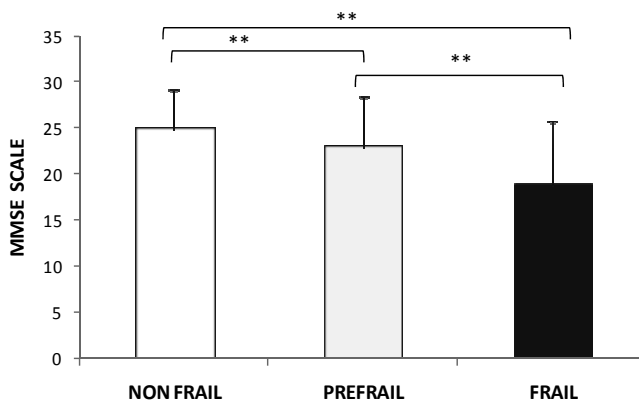


Figure 6.7. Mean score obtained in the MMSE scale by non-frail ($n = 423$), prefrail ($n = 288$) and frail individuals ($n = 65$). Statistical significance is expressed as $**=p<0.01$

In order to be sure that these scores were not due to gender or age effects, we investigated whether differences between men and women or a correlation with age existed.

As shown in Figure 6.8, mean scores obtained by men and women were not significantly different in any group studied. Furthermore, we did not observe a significant correlation between MMSE score and age. Taken together, these results suggest that the lowest score in the MMSE scale, and thus the cognitive impairment, depends on frailty status, rather than gender or age.

Summary of results, discussion and conclusions

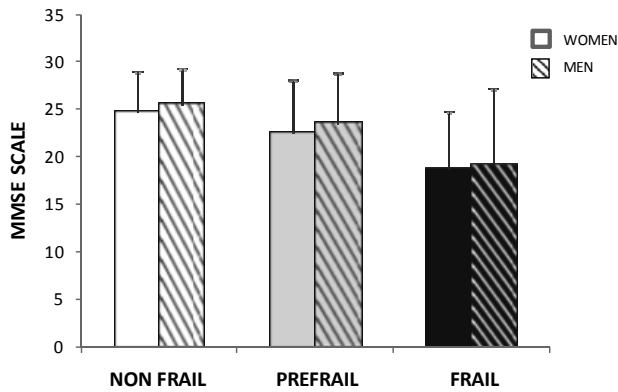


Figure 6.8. Mean score obtained in the MMSE scale by non-frail ($n=423 \rightarrow 179$ men and 244 women), prefrail ($n=288 \rightarrow 120$ men and 168 women) and frail individuals ($n=65 \rightarrow 21$ men y 41 women) by gender

		Age
MMSE scale	Pearson's correlation coefficient	-0.355**
	Sig. (bilateral)	0.000
	n	776

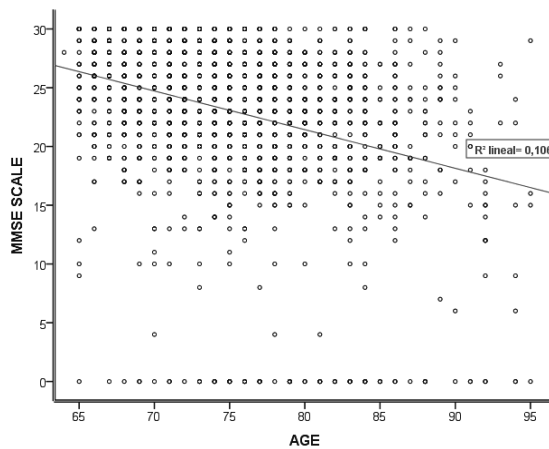


Figure 6.9. Pearson's correlation coefficient and Scatter Plot of MMSE Scale and age. N indicates the total number of subjects sampled and the statistical significance is expressed as **= $p < 0.01$

The relationship between frailty, cognitive impairment and physical inactivity (García-García F. *et al.*, 2011), suggests that a common biological underpinning may exist, so that this relationship might not be merely coincidental and a biomarker for both cognitive impairment and physical inactivity among frail individuals might be detectable. This putative biomarker is BDNF, a neurotrophin whose levels have been reported to be diminished in individuals with cognitive impairment, depression, or physical inactivity (Laske C. *et al.*, 2006; Bocchio-Chiavetto L. *et al.*, 2010; Zoladz J.A. and Pilc A., 2010). This aimed us to measure this neurotrophin levels in our Toledo cohort.

For this purpose, we determined BDNF protein levels present in plasma, because they may reflect those found in the brain (Klein A.B. *et al.*, 2011). They were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to previous studies (Coelho F.M. *et al.*, 2011; Vaughan S. *et al.*, 2014).

As shown in Figure 6.10, frail individuals displayed lower plasma BDNF levels than non frail ($p < 0.05$). This is in agreement with Coelho *et al.*, who reported that non frail women displayed more plasma BDNF levels than prefrail, thus suggesting that the frailty status leads to a decrease in this biomarker levels. Interestingly, these authors confirmed the hypothesis that an exercise protocol could increase plasma BDNF levels in frail individuals, at least in women (Coelho F.M. *et al.*, 2011). Recently, Vaughan *et al.* have conducted a study among women aged 65-75 years, which has confirmed that an exercise protocol has a pronounced beneficial effect, not only on tests of physical and cognitive performance, but also on plasma concentrations of BDNF (Vaughan S. *et al.*, 2014). To the best of our knowledge, however, our study is the first to determine plasma BDNF levels in men and women belonging to all frailty conditions (non frail, prefrail and frail).

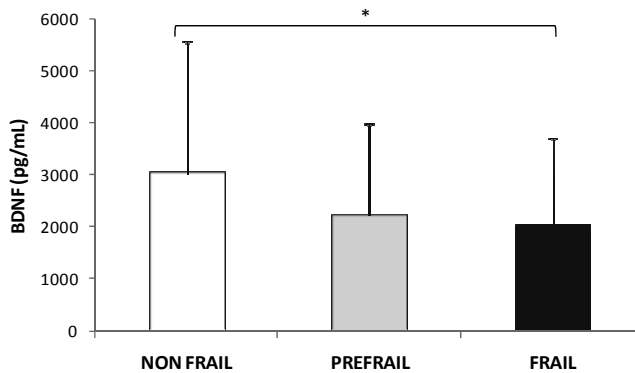


Figure 6.10. Plasma BDNF levels in non frail (n=77), prefrail (n=73) and frail individuals (n=76). Statistical significance is expressed as $*=p<0.017$

Lommatzsch *et al.* reported that women display lower BDNF levels than men (Lommatzsch M. *et al.*, 2005). Furthermore, this study and others suggest a decrease in this biomarker concentration (measured both in serum and plasma) with ageing (Lommatzsch M. *et al.*, 2005; Katoh-Semba R. *et al.*, 2007). Interestingly, in our laboratory, we have observed how spontaneous exercise throughout life can prevent or delay the age-related decline in BDNF levels in mice (Garcia-Valles R. *et al.*, 2013). In this regard, we examined the possible influence of age and gender on the above-mentioned results. As Figure 6.11 indicates, no differences in plasma BDNF levels between men and women were found in any condition (non frail, prefrail, frail). Likewise, we did not find a correlation between plasma BDNF levels and the age of the patient (Figure 6.12). Taken together, these findings suggest that plasma BDNF levels depend on frailty status, rather than gender or age.

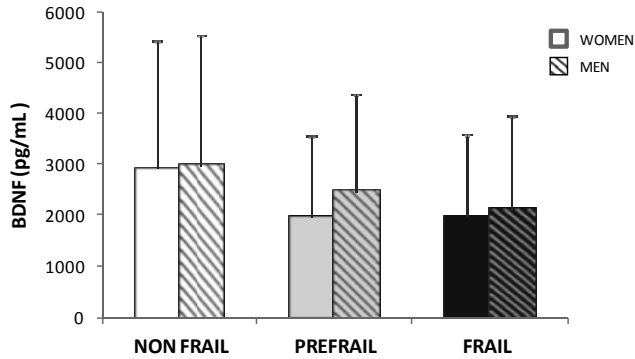


Figure 6.11. Plasma BDNF levels in non frail ($n=77 \rightarrow 32$ men and 45 women), prefrail ($n=73 \rightarrow 34$ men and 39 women) and frail individuals ($n=76 \rightarrow 25$ men and 51 women) by gender

		Age
Plasma BDNF	Pearson's correlation coefficient	-0.063
	Sig. (bilateral)	0.345
	n	226

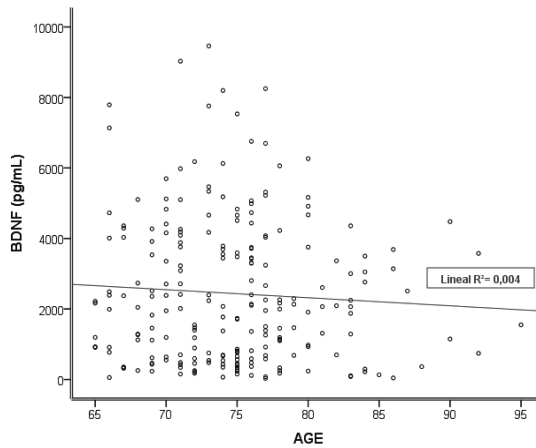


Figure 6.12. Pearson's correlation coefficient and Scatter Plot of plasma BDNF levels and age. N indicates the total number of subjects sampled.

6.4. FRAILTY AND OXIDATIVE STRESS

Maintaining normal or “steady state” redox homeostasis is required for normal cell function. Oxidative stress was first defined by Sies as a disturbance in the prooxidant to antioxidant balance in favor of the former, leading to potential oxidative damage to biomolecules, that can be reflected on their physiological (Sies H., 1985).

In this regard, the free radical theory of aging postulates that a progressive and irreversible accumulation of oxidative damage caused by reactive oxygen species contributes to the age-related impairment of physiological functions (Harman D., 1956). This theory was further modified by Miquel *et al.*, who pointed out that mitochondria, which are the main source and target of free radicals, were the main contributors to age-associated oxidative stress (Miquel J. *et al.*, 1980). The relationship between oxidative stress and aging has been studied in depth, so that old individuals display higher levels of oxidative damage than young ones (Stadman E.R., 1992; Sohal R.S., 1993; Bokov A. *et al.*, 2004). Furthermore, oxidative damage is involved in many pathophysiological processes such as cancer, atherosclerosis, diabetes, neurodegenerative and inflammatory diseases (Durackova Z., 2010; Nogueira V. and Hay N., 2013). Since frailty is a geriatric syndrome, which leads to a decline in physiological reserves and a multi-system dysregulation, the involvement of oxidative stress in frailty is biologically plausible.

As stated before, mitochondria constitute the main source of increased intracellular reactive oxygen species in aging and are major contributors to cellular metabolism. There is a decrease in resting metabolic rate with aging, but

it was postulated in a previous study that, when chronic diseases occur in later life, resting metabolic rate increases because of the greater amount of energy needed to maintain cellular homeostasis (Ruggiero C. and Ferrucci L., 2006). Because frailty is related to the presence of chronic diseases and functional decline, the greater amount of energy required to manage them could be the reason why mitochondria produce excessive quantities of free radicals (Inglés *et al.*, 2014). This increase could also activate the nuclear factor kappa B pathway and lead to inflammation, which has also been linked to frailty (Hubbard R.E. and Woodhouse K.W., 2010).

To test this hypothesis, we determined plasma levels of malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins in our population, as indicators of lipid and protein damage, respectively.

6.4.1. LIPID PEROXIDATION DETERMINED BY MEASURING PLASMA MDA LEVELS

Lipid peroxidation plays an important role in cell aging (Lippman R.D., 1985), and is associated with various different diseases, such as inflammation, atherosclerosis, neurodegenerative diseases and cancer (Gueraud F. *et al.*, 2010). Furthermore, oxidative damage to membrane lipids is most likely to be a key factor in lowering membrane fluidity (Shigenaga M.K. *et al.*, 1994), and is related to longevity of different species (Jove M. *et al.*, 2013).

In this regard, frailty has been associated with oxidative stress markers, such as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (Wu I.C. *et al.*, 2009), ratio of glutathione disulfide to glutathione, malondialdehyde (MDA), and 4-hydroxy-2,3-

nonenal in plasma (Serviddio G. *et al.*, 2009), but these associations were not clearly established. In fact, the question of whether frailty is associated with oxidative stress has not been addressed in a large controlled human cohort, and this was our aim.

Plasma lipid peroxidation was determined as MDA formed from lipid hydroperoxides, which is an established method of accurately measuring oxidative damage to lipids (Nielsen F. *et al.*, 1997). An interlaboratory validation of lipid peroxidation measurement involving several groups showed that the high-performance liquid chromatography (HPLC) method of measuring MDA–TBA adducts that was used in the current study is very specific and sensitive (Breusing N. *et al.*, 2010). Other methods, especially the determination of TBA reactive substances, are not specific and are of little value for studying frailty.

As shown in Figure 6.13, frail people displayed higher plasma MDA levels than prefrail and non frail subjects ($p < 0.01$).

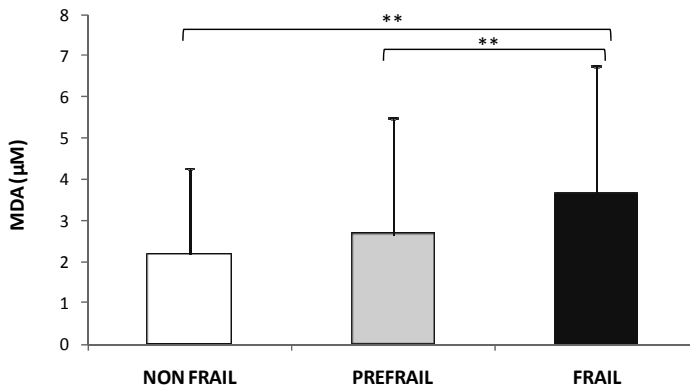


Figure 6.13. Plasma MDA levels in non frail ($n=423$), prefrail ($n=288$) and frail individuals ($n=65$). Statistical significance is expressed as $**=p < 0.01$

Next, we aimed to elucidate the possible influence of age or gender on the results. As we can observe in Figure 6.14, no differences in plasma MDA levels between men and women were found in any group (non frail, prefrail, frail). Moreover, Figure 6.15 shows no correlation between plasma MDA level and the age of the individual. These results suggest that plasma MDA levels, and thus oxidative damage to lipids, depends on frailty status, rather than age or gender.

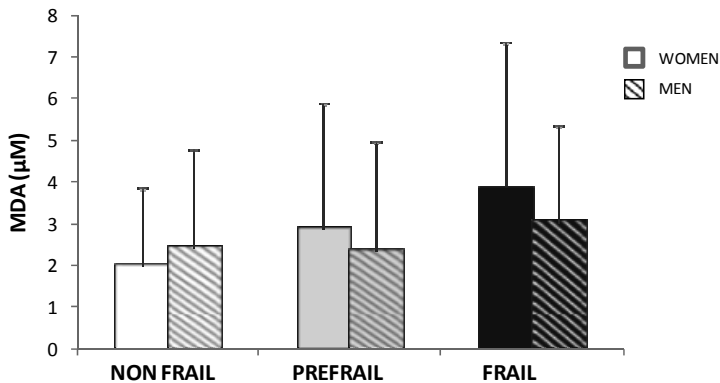


Figure 6.14 Plasma MDA levels in non frail (n=423 → 179 men and 244 women), prefrail (n=288 → 120 men and 168 women) and frail individuals (n=65 → 21 men and 41 women) by gender

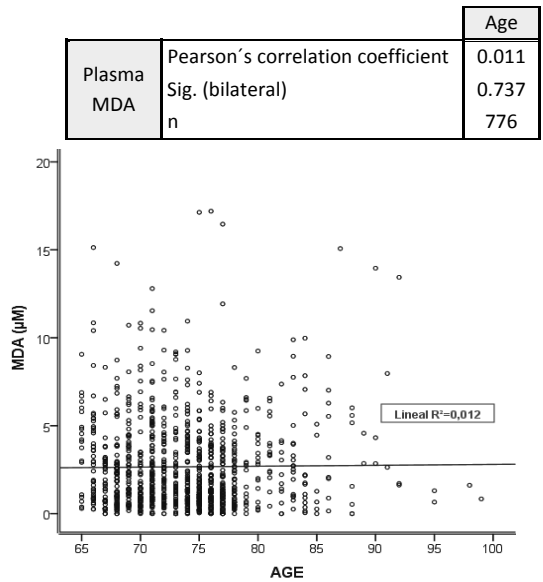


Figure 6.15. Pearson's correlation coefficient and Scatter Plot of plasma MDA levels and age. N indicates the total number of subjects sampled

Interestingly, we have recently published how plasma MDA levels still depend on frailty status after taking into consideration other possible confounders, such as serum lipid profile (high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), total cholesterol, and triglycerides) (Inglés *et al.*, 2014). The same happens when serum cytosolic enzymes, such as aspartate amino transferase, alanine amino transferase, gamma-glutamyl transferase, alkaline phosphatase, and lactate dehydrogenase are considered.

6.4.2. PROTEIN OXIDATION DETERMINED AS PLASMA PROTEIN CARBONYL LEVELS

High levels of oxidative stress modifies the activity of proteins and makes them more susceptible to degradation (Stadman E.R., 1992). At present, the measurement of protein carbonyl groups after their derivatisation with 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) is the most widely utilized measure of protein oxidation. Thus, protein carbonyl oxidation is a good measurement of systemic oxidative stress in humans (Dalle-Donne I. *et al.*, 2003). Interestingly, protein carbonyl levels are associated with low grip strength (Howard C. *et al.*, 2007) and have recently been proposed as a biomarker of severe dependence (de Gonzalo-Calvo D. *et al.*, 2012).

As happened with lipid peroxidation, frail people showed higher plasma levels of protein carbonylation than non frail subjects ($p<0.01$). Prefrail individuals also showed more protein oxidation than non frail ($p<0.01$) (Figure 6.16).

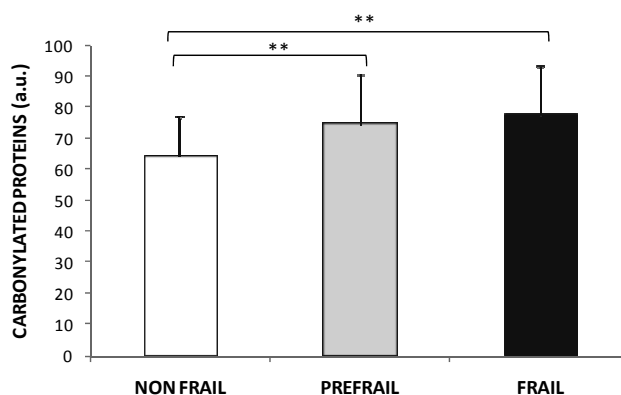


Figure 6.16. Plasma carbonylated protein levels in non frail ($n=53$), prefrail ($n=53$) and frail individuals ($n=50$). Statistical significance is expressed as $**=p<0.01$

Summary of results, discussion and conclusions

Interestingly, neither gender nor age was related to protein carbonyl levels (Figure 6.17 and 6.18), which suggests that protein carbonylation, and thus oxidative damage to proteins is related to frailty status, and not to age or gender.

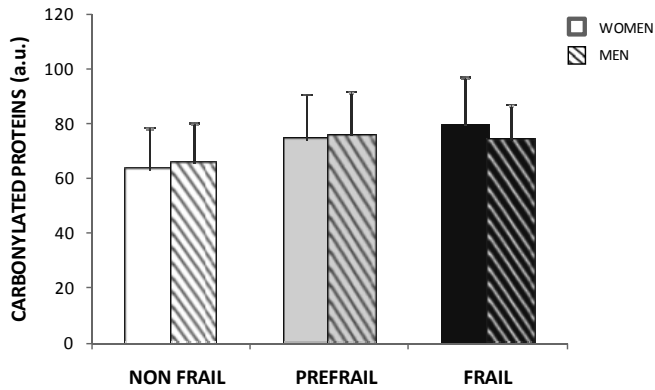


Figure 6.17. Plasma carbonylated protein levels in non frail ($n=53 \rightarrow 22$ men and 31 women), prefrail ($n=53 \rightarrow 24$ men and 29 women) and frail individuals ($n=50 \rightarrow 17$ men and 33 women) by gender.

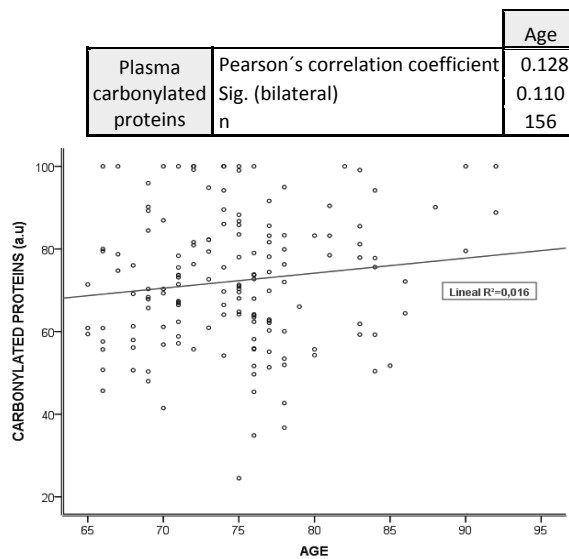


Figure 6.18. Pearson's correlation coefficient and Scatter Plot of plasma carbonylated protein levels and age. N indicates the total number of subjects sampled.

6.5. FRAILTY AND GENETIC VARIANTS

Frailty is a multisystemic syndrome, which is determined by a combination of environmental, genetic and epigenetic factors. These factors regulate the differential gene expression in cells and may be especially important in the development of frailty (Clegg A. *et al.*, 2013).

It has been reported that this genetic component plays a key role in the interindividual variability that affects the development of frailty, with significant gender-related differences: in men, frailty status depends mostly on these genetic factors, whereas in women depends more on environmental factors. Furthermore, it has been observed how the genetic influence is higher at advanced ages (Dato S. *et al.*, 2012).

In addition, the association of genetic polymorphisms with disease or syndrome phenotypes (i.e, frailty phenotype) has a great potential for clinical application, thus providing new and more accurate genetic markers that may help to the diagnosis and prognosis of a disease process. Furthermore, genetic variants may even become potential new therapeutic targets (Suh Y. and Vijg J., 2005). These facts justify the analysis of genetic variants in our study.

The analysis of common (SNPs) and rare variants is in agreement with recent recommendations when studying complex diseases, since they involve many genes and interactions between them (Suh Y. and Vijg J., 2005; Gibson G., 2011). Indeed, we genotyped 295988 SNPs and rare variants. After applying the quality control filtering, 41828 SNPs remained appropriate for the current study. We performed three different types of analysis, which are explained in detail below.

6.5.1. INDIVIDUAL ANALYSIS

In the individual analysis, 15 SNPs and rare variants presented a p value of less than 0.001 (Table 6.2). However, they were not considered statistically significant after applying the Bonferroni correction, which is frequent in association studies, where they are often referred as "SNPs associated with frailty" (Suh Y. and Vijg J., 2005; Ho Y. *y. et al.*, 2011).

8 variants were found in exonic coding regions, of which 5 were non-synonymous (mutations that change the amino acid sequence of a protein) and 3 were synonyms (they do not result in amino acid change). Historically, much of the focus has been on the first, owing to the dogma that structure (and therefore function) of the protein was determined by its amino acid sequence. Considerable evidence uncovered in the last decade show that synonymous mutations are also important, since they can result in aberrant splicing, or affect mRNA stability, and thus protein expression and enzymatic activity (Sauna Z.E. and Kimchi-Sarfaty C., 2011). Furthermore, since 2007 it is known that synonymous mutations can affect protein conformation and have functional and clinical consequences, which can lead to the development of diseases (Kimchi-Sarfaty C. *et al.*, 2007).

We also found 3 variants in intronic regions and 1 in an untranslated region (UTR), all of which are functionally important regulatory regions that may also affect mRNA stability (Prokunina L. and Alarcon-Riquelme M.E., 2004).

SNP	Associated gene	Chromosome	Odd Ratio	P
rs11812479	Unknown	10	3.149	0.000038
rs10457204	FIG4	6	3.345	0.000049
rs737154	SLC12A7	5	2.618	0.000222
rs16889283	AARD	8	2.832	0.000251
rs3773603	CACNA2D3	3	0.233	0.000292
rs3809430	FSCB	14	2.760	0.000386
rs7096031	OTUD1	10	2.923	0.000409
rs4148883	ADH4	4	0.409	0.000429
rs11208257	PGM1	1	3.359	0.000607
rs613444	NFIB	9	0.394	0.000702
rs1929860	CDC42BPA	1	2.514	0.000764
rs11006229	SGMS1	10	0.329	0.000780
rs1126671	ADH4	4	2.412	0.000832
rs1126673	ADH4	4	2.412	0.000832
rs1387144	BDNF-AS	11	2.704	0.000879

Table 6.2. SNPs associated with frailty ($p < 0.001$). Rare and common variants analysis was performed by the PLINK software, using the additive model. Statistical significance was set at $0.05/41828 = 0.000012$

The most statistically significant SNP was found in the FIG4 (*Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate 5-phosphatase*) gene. Since this SNP had an odd ratio higher than 1, it was considered to be a risk SNP. FIG4 encodes a phosphatase that reduces phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI (3,5) P2) levels, which has been linked to difficulties in completing the process of autophagy (Wood C.S. *et al.*, 2009). FIG4 has also been proposed as an insulin-sensitive phosphatase, so that a decrease in FIG 4 levels results in an improvement in insulin resistance (Ikononov O.C. *et al.*, 2009). This could be related to the increase in insulin resistance displayed by frail individuals. In addition, mutations in this gene have been linked to neurodegenerative diseases such as Charcot Marie Tooth (Lenk G.M. *et al.*, 2011), amyotrophic lateral sclerosis (Chow C. *y. et al.*, 2009) and the Yunis-Varon syndrome (Campeau P.M. *et al.*, 2013). All of them are disorders characterized by a progressive functional

impairment, as in the case of frailty syndrome, which may suggest a common underlying physiological basis.

Another variant within CACNA2D3 (*Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3*) gene was among those strongly associated with frailty. In this case, the SNP had an odd ratio less than 1, thus being considered as a protector SNP. CACNA2D3 gene encodes a voltage-dependent calcium channel that, like all calcium channels, can regulate many biological processes related to cell growth, in which calcium is involved, such as proliferation, motility, angiogenesis, apoptosis resistance and transcriptional regulation. All these processes could be altered in the frailty syndrome.

Furthermore, some of the genes within which we found polymorphisms have been associated with tumour processes, which are related to the apoptotic pathway. This pathway, as we will discuss below, is related to frailty in our study. In this regard, the above-mentioned gene, CACNA2D3, has been proposed as a tumour suppressor (Hanke S. *et al.*, 2001; Palmieri C. *et al.*, 2012). We also found 3 SNPs (2 risk and 1 protector) within the ADH4 (*alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide*) gene, whose levels have also been associated with a better overall prognosis in certain cancers (Wei R.R. *et al.*, 2012). NFIB (*nuclear factor I/B*) gene, in which we found one protector SNP, has been proposed as an oncogene, which is overexpressed in some cancers, such as lung cancer, thus promoting proliferation and cell viability (Dooley A.L. *et al.*, 2011). Regarding to the SGMS1 (*sphingomyelin synthase 1*) gene, containing one protector SNP, since an elevated sphingomyelin synthase (SGMS) activity has been associated with processes characterized by an increase in cellular proliferation, it could also be considered as an oncogene (Burns T.A. *et al.*, 2013). The presence of these SNPs

among frail individuals could influence the response to treatment or even the overall progression of the tumour process.

Interestingly, we found variants within genes related to the musculoskeletal system, which is one of the physiological systems playing a major role in the pathogenesis of the frailty syndrome. In this regard, CDC42BPA (*CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)*) gene, containing one risk SNP, encodes a binding protein kinase that may function as a CDC42 downstream effector, thus mediating CDC42- induced peripheral actin formation, and promoting cytoskeletal reorganization. Although not being involved in any specific musculoskeletal function, some other genes in which we found SNPs, such as FIG4, SLC12A7 (*Solute Carrier Family 12 (Potassium/Chloride Transporters), Member 7*), CACNA2D3 or PGM 1 are expressed in muscle and may regulate key cellular processes related to this system.

In addition, we also found variants within genes related to cognition, a process which has also been linked to the frailty syndrome. In this regard, we highlight the BDNF-AS (*BDNF antisense RNA (non-protein coding)*) gene, in which we found one risk SNP. This gene encodes an antisense transcript that uses diverse transcriptional and post-transcriptional mechanisms to regulate the expression of BDNF, both mRNA and protein. Indeed, the inhibition or degradation of BDNF-AS has been reported to up-regulate up to seven-fold BDNF mRNA, increase protein levels, and induce neuronal growth and differentiation, both *in vivo* and *in vitro* (Modarresi F. *et al.*, 2012). Thus, the risk SNP found in this gene may be related to the decreased plasma BDNF levels found in frail people belonging to our Toledo cohort. On the other hand, SGMS1 encoding protein synthesises sphingomyelin, which is a sphingolipid forming part of the myelin sheath that surrounds neurons. This synthesis occurs through the transfer of

phosphocholine from the phosphatidylcholine group on to the primary hydroxyl group of ceramide. The reaction is bidirectional depending on the respective levels of ceramide and the sphingolipid. Thus, ceramide (a negative regulator of cell proliferation) and phosphatidylcholine are consumed, whereas sphingomyelin and diacylglycerol (a mitogenic factor) are formed, which has been linked to its cellular proliferative effect (Huitema K. *et al.*, 2004). Furthermore, it suppresses BAX-mediated apoptosis (BAX is a protein belonging to the pro-apoptotic Bcl-2 sub-families) and cell death in response to certain stimuli, such as hydrogen peroxide (Tafesse F.G. *et al.*, 2007).

6.5.2. GENE ANALYSIS

In this type of analysis, those genes presenting at least two significant and independent SNPs were selected, thus leaving a total of 8139 genes. Although no one passed the Bonferroni multiple test correction ($0.05/8139 = 0.0000061$), Table 6.3 shows those with a p value of less than 0.005.

Associated gene	SNPs	P
TMEM245	3	0.0005
ADH4	3	0.0006
TEX38	2	0.0013
FREM2	10	0.0013
RAD51AP2	7	0.0016
MBIP	2	0.0017
SH3GL3	2	0.0019
SNX14	2	0.0019
CALU	2	0.0020
IVL	2	0.0026
REV1	2	0.0031
ATXN2	2	0.0033
GPR1	2	0.0035
PGLYRP3	2	0.0042
LMBR1	3	0.0044
RP1L1	15	0.0045
CAPN11	3	0.0049
PAX5	2	0.0049

Table 6.3. Genes associated to frailty based on the presence of at least two SNPs ($p < 0.005$). Data analysis was performed by the SKAT test, using the R package *skatMeta*. Statistical significance was set at $0.05/8139 = 0.000061$

As stated before, cognitive function may be impaired in frail individuals. In this regard, we found some genes related to cognitive function, noteworthy among which is the TMEM245 (*transmembrane protein 245*) gene. This gene, containing 3 SNPs, encodes a transmembrane protein, which is associated with the speed of processing information, an important cognitive function (Luciano M. *et al.*, 2011). The presence of SNPs in this gene has been linked to schizophrenia negative symptoms (Xu C. *et al.*, 2013). Another gene related to the central nervous system (CNS) is SH3GL3 (*SH3-domain GRB2-like 3*), which contained 2 SNPs. This gene encodes a novel SH3-containing protein family, called endophilins. In the CNS, it has been suggested that this protein family plays a major role in the signal transduction from membrane receptors and in the

regulation of synaptic vesicles. It is selectively expressed in testis and in brain, where it is believed to contribute to the vulnerability of neuronal cells in Huntington's disease (Sittler A. *et al.*, 1998). We also found 2 SNPs in the ATXN2 (*Ataxin 2*) gene, which is also related to the CNS. The expansion of a CAG trinucleotide repeat in the coding region of this gene can cause Spinocerebellar ataxia type 2, a neurodegenerative disease whose clinical features are: dysarthria, dysdiadochokinesia, sensitivity disorders, hyporeflexia, dementia and ataxia (Lu C.S. *et al.*, 2004). The presence of SNPs within this gene has been associated with amyotrophic lateral sclerosis (Elden A.C. *et al.*, 2010). Another important gene within this subject is PAX 5 (*Paired box 5*) gene, in which we found 2 SNPs. Among other functions, the transcription factor encoded by this gene is involved in the development of CNS (Adams B. *et al.*, 1992). Furthermore, frailty is characterized by an increased vulnerability to external stressors and difficulties to cope with such stress (Fried L.P. *et al.*, 2001). In this regard, we highlight the MBIP (*MAP3K12 binding inhibitory protein 1*) gene, within which we found 2 SNPs. This gene encodes a protein that inhibits MAP3K12 kinase and can induce the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signalling pathway, which is activated by several kinds of cellular stresses, thus producing different physiological defense responses (Fukuyama K. *et al.*, 2000).

As stated before, it has been suggested that inflammation plays a critical role in the development of frailty, and thus several inflammation-related biomarkers have been proposed. In this regard, it is worth pointing out the PGLYRP3 (*Peptidoglycan recognition protein 3*) gene, presenting 2 SNPs, which encodes a peptidoglycan recognition protein, belonging to the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase 2 family. These proteins are part of the innate immune system and recognize peptidoglycan, a component of bacterial cell walls. Thus, they show

a bactericidal role against certain pathogenic and non-pathogenic bacteria, Gram (+) and Gram (-) (Lu X. *et al.*, 2006). Likewise, they decrease the expression of pro-inflammatory cytokines induced by bacterial proteoglycan in intestinal epithelial cells, thus suggesting an anti-inflammatory role (Zenhom M. *et al.*, 2012).

Moreover, we also found genes related to tumour processes, such as PAX5, whose alterations have been associated with the incidence of neoplasms (O'Brien P. *et al.*, 2011).

6.5.3. PATHWAY ANALYSIS

For this pathway-focused analysis, 117 signalling pathways were selected using 3 databases: KEGG, Biocarta and Reactome. Likewise, SNPs genotyped by the Affimetrix “*Axiom® Exome Genotyping Array*”, that were present within genes belonging to these pathways were selected.

Table 6.4 shows our top frailty-related signalling pathways. As we can observe, there were 7 signalling pathways with a p value of less than 0.05 (although no one was statistically significant, as they did not pass the Bonferroni multiple test correction).

Summary of results, discussion and conclusions

Pathway	SNPs	SIG	IND	EMP1	Rs	gene
Starch and sucrose metabolism	94	2	1	0.0020	rs11208257	PGM1
Pentose phosphate pathway	31	2	1	0.0040	rs11208257	PGM1
Intrinsic pathway for apoptosis	28	1	1	0.0070	rs78800940	PMAIP1
Drug metabolism by Cyt p450	139	6	3	0.0144	rs1126671 rs7260329 rs1693482	ADH4 CYP2B6 ADH1C
Metabolism of xenobiotics by Cyt p450	136	6	3	0.0156	rs1126671 rs7260329 rs1693482	ADH4 CYP2B6 ADH1C
Glycolysis, gluconeogenesis	93	9	5	0.0382	rs11208257 rs1126671 rs1693482 rs6050249 rs6741892	PGM1 ADH4 ADH1C ACSS1 GALM
Regulation of actin cytoskeleton	310	6	5	0.0464	rs442856 rs7168069 rs11895564 rs2084385 rs2306022	FGFR4 ITGA11 ITGA6 PAK2 ITGA11

Table 6.4. Pathways associated to frailty, based on the presence of SNPs ($p < 0.05$). Data analysis was performed by the PLINK software. $N^{\circ}SNP$ = SNPs within the pathway, $N^{\circ}SIG$ = Significant SNP, IND= Significant and independent SNPs (after excluding SNPs with high linkage disequilibrium), EMP1= Empirical P-value, which is calculated as the number of times a SNP value is smaller than the observed one, divided by 5000. Statistical significance was set at $0.05/117=0.00043$

As mentioned before, frailty has been associated with biomarkers related to metabolism and to the musculoskeletal system, among others. In this regard, one potentially important molecular mechanism underlying sarcopenia-related loss of muscle mass and the associated muscle weakness is apoptosis (Leeuwenburgh C. *et al*, 2005; Marzetti and Leeuwenburgh C. E., 2006). Indeed, increased levels of intrinsic apoptosis markers (Endo G) have been found after induced atrophy in soleus muscle of aged rats, when compared to young rats (Leeuwenburgh C. *et al.*, 2005).

In consideration of the above, from the pathways shown in Table 6.4, we will highlight the following:

a) Pentose phosphate pathway

We found an independent and significant SNP in the PGM1 (*phosphoglucomutase 1*) gene within this pathway. The pentose phosphate pathway is an alternative to glycolysis, which produces NADPH as reducing equivalents and pentoses as essential parts of nucleotides synthesis. One of the functions of NADPH within the cell is to prevent oxidative stress. It reduces oxidized glutathione to the reduced form, which further allows the conversion of reactive hydrogen peroxide in water by glutathione peroxidase. Indeed, an increase in the activity of this signalling pathway has been observed in situations of oxidative stress (Palmer A.M., 1999), which is related to frailty, as we report in this doctoral thesis. Furthermore, NADPH oxidase, one of major source of endogenous free radicals, oxidizes NADPH to NADP+. It would be logical to assume, therefore, that an increase in NADPH production by this pathway would increase oxidative damage.

On the other hand, as mentioned before, frailty is also related to alterations in glucose metabolism, such as an increase in plasma glucose levels before and 2 hours after oral ingestion of 75g glucose (Walston J . *et al.*, 2002), abdominal obesity (Hubbard RE *et al.*, 2010) and insulin resistance (JI Barzilay *et al.*, 2007). In this regard, this pathway is related to metabolism, as stated before.

b) Intrinsic pathway for apoptosis

This pathway contained 1 independent and significant SNP, which was found in the PMAIP1 (*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 ó NOXA*) gene.

The intrinsic (Bcl-2 inhibitable or mitochondrial) pathway of apoptosis functions in response to various types of intracellular stress including growth factor withdrawal, DNA damage, unfolding stresses in the endoplasmic reticulum and death receptor stimulation. Following the reception of such stress signals, proapoptotic BCL-2 family proteins are activated and subsequently interact with and inactivate antiapoptotic BCL-2 proteins. This interaction leads to the destabilization of the mitochondrial membrane and the release of apoptotic factors. These factors induce the caspase proteolytic cascade, chromatin condensation, and DNA fragmentation, ultimately leading to cell death.

As frailty is characterized by an increased vulnerability to external stressors and difficulties to cope with such stress (Fried L.P. *et al.*, 2001), the relationship between this pathway and frailty is biologically plausible. According to this, Ho and colleagues noted that almost all of the top 20 SNPs more strongly associated with frailty in the Women's Health and Aging Studies (WHAS) I and II, were found in genes related to the regulation of apoptosis, biosynthesis and transcriptional regulation. Interestingly, none of the SNPs within inflammation and muscle maintenance-related genes chosen initially for the study were among the top 20 associated SNPs (Ho Y. y. *et al* 2011).

Furthermore, apoptosis-related genes have been found to be overexpressed in a frail mouse model (Walston J. *et al.*, 2008). Sharpless and

DePinho suggested that heritable intrinsic events slow the self-renewal capacity of stem cells, and noted that apoptosis could accelerate the decline in the regenerative capacity of stem cells that occurs with aging (Sharpless NE and DePinho RA, 2007). They also suggested that this fact may contribute to the development of frailty and age-related diseases.

c) Glycolysis, gluconeogenesis

We found 5 SNPs to be related to these pathways, one in each of the following genes: PGM1 (*phosphoglucomutase 1*), ADH4 (*alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide*), ADH1C (*alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide*), ACSS1 (*Acyl-CoA synthetase short-chain family member 1*) and GALM (*galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)*).

Glycolysis is a metabolic process consisting of a series of enzyme-catalyzed reactions, which convert one molecule of glucose into two molecules of pyruvate with a net production of two molecules of ATP (energy) and two of NADH (reducing power). This pathway is conserved in almost all organisms. On the other hand, gluconeogenesis is a synthesis pathway of glucose from non-carbohydrate precursors. The disruption of the normal functioning of these pathways, in turn, alters cell synthesis, which may promote frailty. Furthermore, the above-mentioned alteration of glucose metabolism may also justify the presence of these SNPs within these pathways.

d) Regulation of actin cytoskeleton

We found 5 SNPs within this pathway: one in the FGFR4 (*fibroblast growth factor receptor 4*) gene, 2 in the ITGA11 (*integrin, alpha 11*) gene, one in the

ITGA6 (*integrin, alpha 6*) gene and finally one in the PAK2 (*p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2*) gene.

Actin belongs to a family of globular proteins forming microfilaments, which are one of the three major components of the cytoskeleton in eukaryotic cells. There are six structurally related actin isoforms: 4 found in muscle (α -skeletal, α -cardiac-, α -vascular and γ -enteric), and two found in the cytoplasm (β -actin and γ -actin). In muscle fibers, actin represents 18-22% of the total protein content and its interaction with myosin in the presence of ATP is essential for muscle contraction (Prochniewicz E. *et al.*, 2007).

Since frailty is associated with alterations in the musculoskeletal system, particularly sarcopenia, disturbance in the regulation of this protein cytoskeleton may be related to frailty. In fact, it has been observed how both small and large actin structural changes may affect normal muscle function (Prochniewicz E. *et al.*, 2004), which is altered in the frailty syndrome.

Furthermore, mutations in 5 of the 6 actin isoforms have been implicated in disease. For example, 117 mutations in the gene encoding the skeletal muscle α -actin (ACTA1) have been associated with severe congenital myopathies (Laing N.G. *et al.*, 2009).

6.6. LIMITATIONS OF THE STUDY

As has already been pointed out repeatedly throughout the discussion of the results, the lack of a control group of young people may result in overlooking the real influence of age on the different studied variables. Since the major aim of

the study was to study a geriatric issue, frailty, therefore we decided not to include young individuals.

It would also have been of interest to include the assessment of physical activity performed by the subject throughout life in the initial interview, in order to understand its potential influence on certain variables, especially on BDNF levels.

Another limitation is the impossibility to measure other parameters of oxidative stress, such as GSH/GSSG ratio, 8-oxodG levels in other sample types, apart from plasma. Moreover, mononuclear cells were not available, which did not allow us to measure antioxidant genes expression, for example. If this had not been the case, we could have determined oxidants and antioxidants levels, in view of accurately determining the relationship between oxidative stress and frailty.

Hence, since it was conceived as a community-level, descriptive study, we could not ascertain the possible effect of any intervention, i.e. an exercise protocol, on frailty.

Finally, although we are aware of the limitations of our study, it enabled us to draw interesting conclusions regarding the existence of new potential biomarkers of frailty.

6.7. CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn from the results obtained in the TSHA:

1. Functional dependence in both ADL and IADL is associated with frailty: in the case of ADL regardless of the individual's gender and age; in the case of IADL regardless of age.
2. Cognitive impairment is associated with frailty, regardless of the individual's gender and age.
3. Lower plasma BDNF levels are associated with frailty, regardless of the individual's gender and age.
4. Greater oxidative damage to lipids and proteins, in terms of plasma MDA and protein carbonyl levels, respectively, is associated with frailty, regardless of the individual's gender and age.
5. Frailty is associated to the presence of genetic polymorphisms, genes and signalling pathways related to important physiopathological processes, such as the musculoskeletal system, cognitive function, energetic metabolism, stress response and apoptosis.

GENERAL CONCLUSION: Frailty is associated with greater functional dependence and cognitive impairment. Parameters such as BDNF, MDA, carbonylated proteins and genetic polymorphisms may be considered as biomarkers of frailty.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abecasis G.R. *et al.* (2010). "A map of human genome variation from population-scale sequencing." Nature **467**(7319): 1061-1073.
- Abellan van Kan G. *et al.* (2008). "The I.A.N.A Task Force on frailty assessment of older people in clinical practice." J Nutr Health Aging **12**(1): 29-37.
- Abizanda P. *et al.* (2000). "Instrumentos de valoración geriátrica integral en los servicios de geriatría de España: Uso heterogéneo de nuestra principal herramienta de trabajo." Rev Esp Geriatr Gerontol **35**(5): 261-268.
- Abizanda P. *et al.* (2010). "Detección y prevención de la fragilidad: una nueva perspectiva de prevención de la dependencia en las personas mayores." Med Clin (Barc) **135**(15): 713-719.
- Abizanda P. *et al.* (2011). "Fragilidad y dependencia en Albacete (estudio FRADEA): razonamiento, diseño y metodología." Rev Esp Geriatr Gerontol **46**(2): 81-88.
- Abizanda P. *et al.* (2005). "Uso apropiado del término fragilidad." Rev Esp Geriatr Gerontol **40**(1): 58-59.
- Adams B. *et al.* (1992). "Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis." Genes Dev **6**(9): 1589-1607.
- Afilalo J. *et al.* (2009). "Role of frailty in patients with cardiovascular disease." Am J Cardiol **103**(11): 1616-1621.
- Ahmed N. *et al.* (2007). "Frailty: an emerging geriatric syndrome." Am J Med **120**(9): 748-753.
- Al Snih S. *et al.* (2004). "Hand grip strength and incident ADL disability in elderly Mexican Americans over a seven-year period." Aging Clin Exp Res **16**(6): 481-486.
- Alarcón T. and González Montalvo J.I. (1997). "Fragilidad y vejez compañeros inevitables de camino." Rev Esp Geriatr Gerontol **32**(1): 1-2.
- Albertini R. *et al.* (1996). "The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation." Arch. Biochem. Biophys. **327**(2): 207-214.

Bibliografía

- Alberts B. *et al.* (2010). DNA, cromosomas y genomas. Biología molecular de la célula. Omega. Barcelona. **1**: 195-262.
- Alderson R.F. *et al.* (1990). "Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture." Neuron **5**(3): 297-306.
- Almeida O.P. *et al.* (2012). "CRP 1846G>A polymorphism increases risk of frailty." Maturitas **71**(3): 261-266.
- Alvarado B.E. *et al.* (2008). "Life course social and health conditions linked to frailty in Latin American older men and women." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **63**(12): 1399-1406.
- Ariño S. and Benavent R. (2002). "La valoración geriátrica integral, una herramienta fundamental para el diagnóstico y el tratamiento." JANO **62**(1435): 41-43.
- Arking D.E. *et al.* (2006). "Variation in the ciliary neurotrophic factor gene and muscle strength in older Caucasian women." J Am Geriatr Soc **54**(5): 823-826.
- Avila-Funes J.A. *et al.* (2009). "Cognitive impairment improves the predictive validity of the phenotype of frailty for adverse health outcomes: the three-city study." J Am Geriatr Soc **57**(3): 453-461.
- Baeza I. *et al.* (2009). "Improvement of leucocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens." J Reprod Immunol **80**(1-2): 70-79.
- Balaban R.S. *et al.* (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." Cell **120**(4): 483-495.
- Balding D.J. (2006). "A tutorial on statistical methods for population association studies." Nat Rev Genet **7**(10): 781-791.
- Bandein-Roche K. *et al.* (2006). "Phenotype of frailty: characterization in the women's health and aging studies." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **61**(3): 262-266.

- Barja G. (2002). "Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity." Free Radic Biol Med **33**(9): 1167-1172.
- Barzilay J.I. *et al.* (2007). "Insulin resistance and inflammation as precursors of frailty: the Cardiovascular Health Study." Arch Intern Med **167**(7): 635-641.
- Batzán J.J. (2006). "Función y fragilidad: ¿qué tenemos que medir?" Rev Esp Geriatr Gerontol **41**(Supl 1): 36-42.
- Baylis D. *et al.* (2012). "Immune-endocrine biomarkers as predictors of frailty and mortality: a 10-year longitudinal study in community-dwelling older people." Age (Dordr).
- Beal M.F. (2002). "Oxidatively modified proteins in aging and disease." Free Radic Biol Med **32**(9): 797-803.
- Beasley J.M. *et al.* (2010). "Protein intake and incident frailty in the Women's Health Initiative observational study." J Am Geriatr Soc **58**(6): 1063-1071.
- Benjamini Y. and Hochberg Y. (1995). "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing." J R Stat Soc Series B Stat Methodol **57**(1): 289-300.
- Benzi G. and Moretti A. (1995). "Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system." Free Rad. Biol. Med. **19**(1): 77-101.
- Berlett B.S. and Stadtman E.R. (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." J Biol Chem **272**(33): 20313-20316.
- Bird R.P. and Draper H.H. (1984). "Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination." Methods Enzymol **105**: 299-305.
- Bjelakovic G. *et al.* (2007). "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis." JAMA **297**(8): 842-857.
- Ble A. *et al.* (2006). "Lower plasma vitamin E levels are associated with the frailty syndrome: the InCHIANTI study." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **61**(3): 278-283.

Bibliografía

- Bocchio-Chiavetto L. *et al.* (2010). "Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses." World J Biol Psychiatry **11**(6): 763-773.
- Bokov A. *et al.* (2004). "The role of oxidative damage and stress in aging." Mech Ageing Dev **125**(10-11): 811-826.
- Borel J.P. *et al.* (1988). Med. Sci. **5**: 304-311.
- Borras C. *et al.* (2003). "Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males." Free Radic Biol Med **34**(5): 546-552.
- Bortz W.M. (2002). "A conceptual framework of frailty: A review." Journal of Gerontology **57A**(5): 283-288.
- Boveris A. and Chance B.C. (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **143**: 707-716.
- Boyle P.A. *et al.* (2010). "Physical frailty is associated with incident mild cognitive impairment in community-based older persons." J Am Geriatr Soc **58**(2): 248-255.
- Breusing N. *et al.* (2010). "An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples." Free Radic Res **44**(10): 1203-1215.
- Brookes A.J. (1999). "The essence of SNPs." Gene **234**(2): 177-186.
- Brunet-Rossinni A.K. (2004). "Reduced free-radical production and extreme longevity in the little brown bat (*Myotis lucifugus*) versus two non-flying mammals." Mech Ageing Dev **125**(1): 11-20.
- Buchman A.S. *et al.* (2007). "Frailty is associated with incident Alzheimer's disease and cognitive decline in the elderly." Psychosom Med **69**(5): 483-489.
- Buchner D.M. and Wagner E.H. (1992). "Preventing frail health." Clin Geriatr Med **8**(1): 1-17.

- Burns T.A. *et al.* (2013). "Sphingomyelin synthase 1 activity is regulated by the BCR-ABL oncogene." J Lipid Res **54**(3): 794-805.
- Bustamante C.D. *et al.* (2011). "Genomics for the world." Nature **475**(7355): 163-165.
- Campbell A.J. and Buchner D.M. (1997). "Unstable disability and the fluctuations of frailty." Age Ageing **26**(4): 315-318.
- Campeau P.M. *et al.* (2013). "Yunis-Varon syndrome is caused by mutations in FIG4, encoding a phosphoinositide phosphatase." Am J Hum Genet **92**(5): 781-791.
- Castelblanque E. and Albert Cuñat V. (2002). "¿Quiénes son los ancianos frágiles-ancianos de riesgo? Estudio en personas mayores de 65 años del Área Sanitaria de Guadalajara." Medicina General **45**: 443-680.
- Cesari M. *et al.* (2004). "Inflammatory markers and physical performance in older persons: the InCHIANTI study." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **59**(3): 242-248.
- Clegg A. *et al.* (2012). "Do home-based exercise interventions improve outcomes for frail older people?" Rev Clin Gerontol **22**(01): 68-78.
- Clegg A. *et al.* (2013). "Frailty in elderly people." Lancet **381**(9868): 752-762.
- Coelho F.M. *et al.* (2011). "Physical therapy intervention (PTI) increases plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in non-frail and pre-frail elderly women." Arch Gerontol Geriatr.
- Collard R.M. *et al.* (2012). "Prevalence of frailty in community-dwelling older persons: a systematic review." J Am Geriatr Soc **60**(8): 1487-1492.
- Conner J.M. *et al.* (1997). "Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport." J Neurosci **17**(7): 2295-2313.
- Connor B. *et al.* (1997). "Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease." Brain Res Mol Brain Res **49**(1-2): 71-81.

- Cruz-Jentoft A.J. *et al.* (2010). "Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People." Age Ageing **39**(4): 412-423.
- Cutler R.G. (1984). Antioxidants, aging and longevity. Free radicals in biology. Pryor W.A. Orlando, Academic Press. **IV**: 371-428.
- Chance B. *et al.* (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol. Rev. **59**: 527-605.
- Cheeseman K.H. and Slater T.F. (1993). "An introduction to free radical biochemistry." Br. Med. Bull. **49**(3): 588-603.
- Chen X. *et al.* (2014). "Frailty syndrome: an overview." Clin Interv Aging **9**: 433-441.
- Chevion M. *et al.* (2000). "Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage." Free Radic Res **33** **Suppl**: S99-108.
- Chow C.Y. *et al.* (2009). "Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS." Am J Hum Genet **84**(1): 85-88.
- Chung H.Y. *et al.* (2002). "Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction." Microsc Res Tech **59**(4): 264-272.
- Dalle-Donne I. *et al.* (2003). "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress." Clin Chim Acta **329**(1-2): 23-38.
- Dancey C. and Reidy J., Eds. (2004). Statistics without maths for psychology: using SPSS for windows. London, Prentice Hall.
- Dato S. *et al.* (2012). "Frailty phenotypes in the elderly based on cluster analysis: a longitudinal study of two Danish cohorts. Evidence for a genetic influence on frailty." Age (Dordr) **34**(3): 571-582.
- Davies K.J. *et al.* (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein." J Biol Chem **262**(20): 9914-9920.

- Davies K.J. *et al.* (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." Biochem Biophys Res Commun **107**(4): 1198-1205.
- de Gonzalo-Calvo D. *et al.* (2012). "Oxidative protein damage is associated with severe functional dependence among the elderly population: a principal component analysis approach." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **67**(6): 663-670.
- De la Fuente C. (2001). Fundamentos demográficos y biomédicos para una atención sanitaria específica al anciano. Bases de la Atención Sanitaria al Anciano. Rodríguez Mañas L.S.J., JJ. Madrid Sociedad Española de Medicina Geriátrica; : 15-55.
- De Martinis M. *et al.* (2006). "Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly." Exp Mol Pathol **80**(3): 219-227.
- de Vries N.M. *et al.* (2012). "Effects of physical exercise therapy on mobility, physical functioning, physical activity and quality of life in community-dwelling older adults with impaired mobility, physical disability and/or multi-morbidity: a meta-analysis." Ageing Res Rev **11**(1): 136-149.
- Dean R.T. *et al.* (1993). "Reactive species and their accumulation on radical damaged proteins." TIBS. **18**: 437-441.
- Dooley A.L. *et al.* (2011). "Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer." Genes Dev **25**(14): 1470-1475.
- Droge W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Durackova Z. (2010). "Some current insights into oxidative stress." Physiol Res **59**(4): 459-469.
- Elden A.C. *et al.* (2010). "Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS." Nature **466**(7310): 1069-1075.
- Ershler W.B. (2007). "A gripping reality: oxidative stress, inflammation, and the pathway to frailty." J Appl Physiol **103**(1): 3-5.

Bibliografía

- Esterbauer H. *et al.* (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol Med **11**(1): 81-128.
- Evans L.K. *et al.* (1995). "The CARE Program: a nurse-managed collaborative outpatient program to improve function of frail older people. Collaborative Assessment and Rehabilitation for Elders." J Am Geriatr Soc **43**(10): 1155-1160.
- Fairhall N. *et al.* (2011). "Treating frailty--a practical guide." BMC Med **9**: 83.
- Ferrucci L. *et al.* (2002). "Biomarkers of frailty in older persons." J Endocrinol Invest **25**(10 Suppl): 10-15.
- Ferrucci L. *et al.* (2004). "Designing randomized, controlled trials aimed at preventing or delaying functional decline and disability in frail, older persons: a consensus report." J Am Geriatr Soc **52**(4): 625-634.
- Ferrucci L. *et al.* (2002). "Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels." J Am Geriatr Soc **50**(12): 1947-1954.
- Fiatarone M.A. *et al.* (1994). "Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people." N Engl J Med **330**(25): 1769-1775.
- Finch C.E. and Tanzi R.E. (1997). "Genetics of aging." Science **278**(5337): 407-411.
- Finkel T. and Holbrook N.J. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-247.
- Flacker J.M. (2003). "What is a geriatric syndrome anyway?" J Am Geriatr Soc **51**(4): 574-576.
- Folstein M.F. *et al.* (1975). ""Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." J Psychiatr Res **12**(3): 189-198.
- Freeman B.A. and Crapo J. (1982). "Biology of disease: Free radicals and tissue injure." Lab. Invest. **47**: 412-426.

- Fridovich I. (1978). "The biology of oxygen radicals." Science **201**(4359): 875-880.
- Fried L.P. *et al.* (2004). "Untangling the concepts of disability, frailty, and comorbidity: implications for improved targeting and care." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **59**(3): 255-263.
- Fried L.P. *et al.* (2001). "Frailty in older adults: evidence for a phenotype." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **56**(3): M146-156.
- Fried L.P. *et al.* (2009). "Nonlinear multisystem physiological dysregulation associated with frailty in older women: implications for etiology and treatment." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **64**(10): 1049-1057.
- Fukuyama K. *et al.* (2000). "MAPK upstream kinase (MUK)-binding inhibitory protein, a negative regulator of MUK/dual leucine zipper-bearing kinase/leucine zipper protein kinase." J Biol Chem **275**(28): 21247-21254.
- Furukawa S. *et al.* (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-1761.
- Garatachea N. *et al.* (2012). "Single and combined influence of ACE and ACTN3 genotypes on muscle phenotypes in octogenarians." Eur J Appl Physiol **112**(7): 2409-2420.
- Garatachea N. and Lucia A. (2013). "Genes, physical fitness and ageing." Ageing Res Rev **12**(1): 90-102.
- García-García F. *et al.* (2011). "Fragilidad: un fenotipo en revisión." Gac Sanit Suppl **2**: 51-58.
- García-García F.J. *et al.* (2014). "A new operational definition of frailty: the frailty trait scale." J Am Med Dir Assoc **15**(5): 371 e377-371 e313.
- García-García F.J. *et al.* (2011). "The prevalence of frailty syndrome in an older population from Spain. The Toledo Study for Healthy Aging." J Nutr Health Aging **15**(10): 852-856.
- García-Valles R. *et al.* (2013). "Life-long spontaneous exercise does not prolong lifespan but improves health span in mice." Longev Healthspan **2**(1): 14.

Bibliografía

- Garcia Garcia F.J. *et al.* (2001). "[The prevalence of dementia and its main subtypes in subjects older than 65 years: impact of occupation and education. The Toledo Study]." Med Clin (Barc) **116**(11): 401-407.
- Gibson G. (2011). "Rare and common variants: twenty arguments." Nat Rev Genet **13**(2): 135-145.
- Gill T.M. *et al.* (2002). "A program to prevent functional decline in physically frail, elderly persons who live at home." N Engl J Med **347**(14): 1068-1074.
- Greenwald R.A. and Moy W.W. (1980). "Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid." Arthritis Rheum. **23**: 455-463.
- Gruenewald T.L. *et al.* (2009). "Allostatic load and frailty in older adults." J Am Geriatr Soc **57**(9): 1525-1531.
- Gueraud F. *et al.* (2010). "Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products." Free Radic Res **44**(10): 1098-1124.
- Guralnik J.M. *et al.* (1994). "A short physical performance battery assessing lower extremity function: association with self-reported disability and prediction of mortality and nursing home admission." J Gerontol **49**(2): M85-94.
- Halliwell B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease." Am. J. Med. **91**(3C): 14S-22S.
- Halliwell B. (1994). "Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?" Lancet **344**: 721-724.
- Halliwell B. (1996). "Antioxidants in human health and disease." Annu. Rev. Nutr. **16**: 33-50.
- Halliwell B. (2000). "The antioxidant paradox." Lancet **355**(9210): 1179-1180.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M. (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." Methods Enzymol **186**: 1-85.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M. (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems." Free Radic Biol Med **18**(1): 125-126.

- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1985). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, Clarendon Press.
- Halliwell B.G., J.M.C. (1989). "Free radicals in biology and medicine." Clarendon press, Oxford.
- Hamerman D. (1999). "Toward an understanding of frailty." Ann Intern Med **130**(11): 945-950.
- Hanke S. *et al.* (2001). "Cloning a calcium channel alpha2delta-3 subunit gene from a putative tumor suppressor gene region at chromosome 3p21.1 in conventional renal cell carcinoma." Gene **264**(1): 69-75.
- Harman D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J. Gerontol. **2**: 298-300.
- Harman D. (2001). "Aging: overview." Ann N Y Acad Sci **928**: 1-21.
- Hayflick L. (2000). "The future of ageing." Nature **408**(6809): 267-269.
- Hirsch C. *et al.* (2006). "The association of race with frailty: the cardiovascular health study." Ann Epidemiol **16**(7): 545-553.
- Ho Y.Y. *et al.* (2011). "Exploring biologically relevant pathways in frailty." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **66**(9): 975-979.
- Hofer M.M. and Barde Y.A. (1988). "Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo." Nature **331**(6153): 261-262.
- Hohn A. *et al.* (2013). "Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins." J Proteomics **92**: 132-159.
- Holanda C.M. *et al.* (2012). "Salivary cortisol and frailty syndrome in elderly residents of long-stay institutions: A cross-sectional study." Arch Gerontol Geriatr **54**(2): e146-151.
- Howard C. *et al.* (2007). "Oxidative protein damage is associated with poor grip strength among older women living in the community." J Appl Physiol **103**(1): 17-20.

Bibliografía

- Howard C. *et al.* (2007). "Oxidative protein damage is associated with poor grip strength among older women living in the community." J Appl Physiol (1985) **103**(1): 17-20.
- Howells D.W. *et al.* (2000). "Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra." Exp Neurol **166**(1): 127-135.
- Howes R.M. (2006). "The free radical fantasy: a panoply of paradoxes." Ann N Y Acad Sci **1067**: 22-26.
- Huang T.T. *et al.* (2000). "Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **55**(1): B5-9.
- Hubbard R.E. *et al.* (2010). "Frailty, body mass index, and abdominal obesity in older people." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **65**(4): 377-381.
- Hubbard R.E. and Woodhouse K.W. (2010). "Frailty, inflammation and the elderly." Biogerontology **11**(5): 635-641.
- Huitema K. *et al.* (2004). "Identification of a family of animal sphingomyelin synthases." EMBO J **23**(1): 33-44.
- Hyde Z. *et al.* (2010). "Low free testosterone predicts frailty in older men: the health in men study." J Clin Endocrinol Metab **95**(7): 3165-3172.
- Ikonomov O.C. *et al.* (2009). "Sac3 is an insulin-regulated phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate phosphatase: gain in insulin responsiveness through Sac3 down-regulation in adipocytes." J Biol Chem **284**(36): 23961-23971.
- Inglés M., *et al.* (2014). "Oxidative stress is related to frailty, not to age or sex, in a geriatric population: lipid and protein oxidation as biomarkers of frailty". J Am Geriatr Soc **62**(7):1324-8
- Instituto nacional de estadística (INE) (2012). "Proyecciones de población a largo plazo". Madrid, España.
- Ishii N. *et al.* (2004). "Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress." Mech Ageing Dev **125**(1): 41-46.

- Jove M. *et al.* (2013). "Plasma long-chain free fatty acids predict mammalian longevity." Sci Rep **3**: 3346.
- Judge J.O. *et al.* (1996). "The relationship between physical performance measures and independence in instrumental activities of daily living. The FICSIT Group. Frailty and Injury: Cooperative Studies of Intervention Trials." J Am Geriatr Soc **44**(11): 1332-1341.
- Jurschik Gimenez P. *et al.* (2011). "[Frailty criteria in the elderly: a pilot study]." Aten Primaria **43**(4): 190-196.
- Kapczinski F. *et al.* (2008). "Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes." Rev Bras Psiquiatr **30**(3): 243-245.
- Katoh-Semba R. *et al.* (2007). "Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls." Int J Dev Neurosci **25**(6): 367-372.
- Katz S. *et al.* (1963). "Studies of Illness in the Aged. The Index of Adl: A Standardized Measure of Biological and Psychosocial Function." JAMA **185**: 914-919.
- Keller J.N. *et al.* (2005). "Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment." Neurology **64**(7): 1152-1156.
- Kerschensteiner M. *et al.* (1999). "Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?" J Exp Med **189**(5): 865-870.
- Kiely D.K. *et al.* (2009). "Validation and comparison of two frailty indexes: The MOBILIZE Boston Study." J Am Geriatr Soc **57**(9): 1532-1539.
- Kimchi-Sarfaty C. *et al.* (2007). "A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity." Science **315**(5811): 525-528.
- Klein A.B. *et al.* (2011). "Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species." Int J Neuropsychopharmacol **14**(3): 347-353.

Bibliografía

- Klein R.J. *et al.* (2005). "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." Science **308**(5720): 385-389.
- Knight J.A. *et al.* (1988). "Urinary lipoperoxides quantified by liquid chromatography, and determination of reference values for adults." Clin Chem **34**(6): 1107-1110.
- Korsching S. (1993). "The neurotrophic factor concept: a reexamination." J Neurosci **13**(7): 2739-2748.
- Korte M. *et al.* (1995). "Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8856-8860.
- Krinsky N. (1994). Natural antioxidants in human health and disease. Frei B. San Diego, Academic Press: 239-262.
- LaFrance W.C., Jr. *et al.* (2010). "Decreased serum BDNF levels in patients with epileptic and psychogenic nonepileptic seizures." Neurology **75**(14): 1285-1291.
- Laing N.G. *et al.* (2009). "Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1)." Hum Mutat **30**(9): 1267-1277.
- Lambert A.J. *et al.* (2007). "Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms." Aging Cell **6**(5): 607-618.
- Lang T. *et al.* (2010). "Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment." Osteoporos Int **21**(4): 543-559.
- Lapointe J. and Hekimi S. (2010). "When a theory of aging ages badly." Cell Mol Life Sci **67**(1): 1-8.
- Laske C. *et al.* (2006). "Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease." J Neural Transm **113**(9): 1217-1224.
- Lauretani F. *et al.* (2003). "Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia." J Appl Physiol **95**(5): 1851-1860.

- Lawton M.P. and Brody E.M. (1969). "Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living." Gerontologist **9**(3): 179-186.
- Leeuwenburgh C. *et al.* (2005). "Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(5): R1288-1296.
- Leng S.X. *et al.* (2004). "Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), and their relationships with serum interleukin-6, in the geriatric syndrome of frailty." Aging Clin Exp Res **16**(2): 153-157.
- Lenk G.M. *et al.* (2011). "Pathogenic mechanism of the FIG4 mutation responsible for Charcot-Marie-Tooth disease CMT4J." PLoS Genet **7**(6): e1002104.
- Lin Y.T. *et al.* (2011). "Up-regulation of dorsal root ganglia BDNF and trkB receptor in inflammatory pain: an in vivo and in vitro study." J Neuroinflammation **8**: 126.
- Lippman R.D. (1985). "Rapid *in vivo* quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man." Exp. Gerontol. **20**: 1-5.
- Liu Y. *et al.* (2014). "Mitochondrial free radical theory of aging: Who moved my premise?" Geriatr Gerontol Int.
- Lo D.C. (1995). "Neurotrophic factors and synaptic plasticity." Neuron **15**(5): 979-981.
- Lommatzsch M. *et al.* (2005). "The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma." Neurobiol Aging **26**(1): 115-123.
- Lowry O.H. *et al.* (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Lu C.S. *et al.* (2004). "The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 2." Arch Neurol **61**(1): 35-38.
- Lu X. *et al.* (2006). "Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins." J Biol Chem **281**(9): 5895-5907.

Bibliografía

- Luciano M. *et al.* (2011). "Whole genome association scan for genetic polymorphisms influencing information processing speed." *Biol Psychol* **86**(3): 193-202.
- MacAuley A. and Ladiges W.C. (2005). "Approaches to determine clinical significance of genetic variants." *Mutat Res* **573**(1-2): 205-220.
- Mahoney F.I. and Barthel D.W. (1965). "Functional Evaluation: The Barthel Index." *Md State Med J* **14**: 61-65.
- Mañas R. (2001). "Aproximación al desarrollo de un Programa Nacional de Investigación sobre Envejecimiento desde el concepto de fragilidad." *Rev Esp Geriatr Gerontol* **36**(3): 24-35.
- Martín-Lesende I. *et al.* (2006). "Identificación de ítems para la creación de un cuestionario de valoración de actividades instrumentales de la vida diaria en personas mayores." *Aten Primaria* **37**(6): 313-319.
- Marzetti E. and Leeuwenburgh C. (2006). "Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age." *Exp Gerontol* **41**(12): 1234-1238.
- Matteini A.M. *et al.* (2010). "Transcobalamin-II variants, decreased vitamin B12 availability and increased risk of frailty." *J Nutr Health Aging* **14**(1): 73-77.
- Matthews V.B. *et al.* (2009). "Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase." *Diabetologia* **52**(7): 1409-1418.
- Mattson M.P. *et al.* (1995). "Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons." *J Neurochem* **65**(4): 1740-1751.
- McCarthy M.I. *et al.* (2008). "Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges." *Nat Rev Genet* **9**(5): 356-369.
- McCord J.M. (1974). "Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase." *Science* **185**: 5229-5531.

- Miquel J. *et al.* (1980). "Mitochondrial role in cell aging." Exp Gerontol **15**(6): 575-591.
- Miquel J. *et al.* (1980). "Mitochondrial role in cell aging." Exp. Gerontol. **15**: 579-591.
- Mitnitski A.B. *et al.* (2002). "Frailty, fitness and late-life mortality in relation to chronological and biological age." BMC Geriatr **2**: 1.
- Mitnitski A.B. *et al.* (2002). "The mortality rate as a function of accumulated deficits in a frailty index." Mech Ageing Dev **123**(11): 1457-1460.
- Modarresi F. *et al.* (2012). "Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation." Nat Biotechnol **30**(5): 453-459.
- Moore A.Z. *et al.* (2010). "Polymorphisms in the mitochondrial DNA control region and frailty in older adults." PLoS One **5**(6): e11069.
- Morgan M.J. and Liu Z.G. (2011). "Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling." Cell Res **21**(1): 103-115.
- Mussol J. (2002). "Resultados de la aplicación en atención primaria de un protocolo de valoración geriátrica integral en ancianos de riesgo." Rev Esp Geriatr Gerontol **37**(5): 249-253.
- Nakagawa T. *et al.* (2002). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulates glucose and energy metabolism in diabetic mice." Diabetes Metab Res Rev **18**(3): 185-191.
- Nielsen F. *et al.* (1997). "Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors." Clin Chem **43**(7): 1209-1214.
- Noble E.E. *et al.* (2011). "The lighter side of BDNF." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **300**(5): R1053-1069.
- Nogueira V. and Hay N. (2013). "Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy." Clin Cancer Res **19**(16): 4309-4314.

Bibliografía

- Nourhashemi F. *et al.* (2001). "Instrumental activities of daily living as a potential marker of frailty: a study of 7364 community-dwelling elderly women (the EPIDOS study)." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **56**(7): M448-453.
- O'Brien P. *et al.* (2011). "The Pax-5 gene: a pluripotent regulator of B-cell differentiation and cancer disease." Cancer Res **71**(24): 7345-7350.
- Observatorio de la sostenibilidad en España (OSE) (2010). "Informe de sostenibilidad en España".
- Organización mundial de la salud (OMS) (2002). "Envejecimiento activo: un marco político." Rev Esp Geriatr Gerontol **37**(S2): 74-105.
- Organización mundial de la salud (OMS) (2011) "Envejecimiento y ciclo de vida". Ginebra, Suiza.
- Organización mundial de la salud (OMS) (2013) "Estadísticas sanitarias mundiales". Ginebra, Suiza.
- Orme J.G. *et al.* (1986). "Factorial and discriminant validity of the Center for Epidemiological Studies Depression (CES-D) scale." J Clin Psychol **42**(1): 28-33.
- Orr W.C. and Sohal R.S. (1994). "Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*." Science **263**(5150): 1128-1130.
- Ottenbacher K.J. *et al.* (2009). "Mexican Americans and frailty: findings from the Hispanic established populations epidemiologic studies of the elderly." Am J Public Health **99**(4): 673-679.
- P Abizanda J.L.-T., L Romero, M López, P M Sánchez, P Atienzar (2011). "Fragilidad y dependencia en Albacete (estudio FRADEA): razonamiento, diseño y metodología." Rev Esp Geriatr Gerontol **46**(2): 81-88.
- Paabo S. (2003). "The mosaic that is our genome." Nature **421**(6921): 409-412.
- Pacifici R.E. and Davies K.J. (1991). "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited." Gerontology **37**(1-3): 166-180.

- Palmer A.M. (1999). "The activity of the pentose phosphate pathway is increased in response to oxidative stress in Alzheimer's disease." J Neural Transm **106**(3-4): 317-328.
- Palmieri C. *et al.* (2012). "Methylation of the calcium channel regulatory subunit alpha2delta-3 (CACNA2D3) predicts site-specific relapse in oestrogen receptor-positive primary breast carcinomas." Br J Cancer **107**(2): 375-381.
- Park H.R. *et al.* (2010). "A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor." Neurosci Lett **482**(3): 235-239.
- Perez V.I. *et al.* (2009). "The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice." Aging Cell **8**(1): 73-75.
- Powers S.K. *et al.* (2007). "Oxidative stress and disuse muscle atrophy." J Appl Physiol **102**(6): 2389-2397.
- Prochniewicz E. *et al.* (2007). "Age-related decline in actomyosin structure and function." Exp Gerontol **42**(10): 931-938.
- Prochniewicz E. *et al.* (2004). "Structural dynamics of actin during active interaction with myosin: different effects of weakly and strongly bound myosin heads." Biochemistry **43**(33): 10642-10652.
- Prokunina L. and Alarcon-Riquelme M.E. (2004). "Regulatory SNPs in complex diseases: their identification and functional validation." Expert Rev Mol Med **6**(10): 1-15.
- Puts M.T. *et al.* (2005). "Endocrine and inflammatory markers as predictors of frailty." Clin Endocrinol (Oxf) **63**(4): 403-411.
- Quick K.L. *et al.* (2008). "A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice." Neurobiol Aging **29**(1): 117-128.
- Ranieri P. *et al.* (1998). "Serum cholesterol levels as a measure of frailty in elderly patients." Exp Aging Res **24**(2): 169-179.
- Rasmussen P. *et al.* (2009). "Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise." Exp Physiol **94**(10): 1062-1069.

- Redín J.M. (1999). "Valoración geriátrica integral (I): Evaluación del paciente geriátrico y concepto de fragilidad." Anales del Sistema Sanitario de Navarra **22**(1): 41-50.
- Reichardt L.F. (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1473): 1545-1564.
- Reuben D.B. *et al.* (2000). "The prognostic value of serum albumin in healthy older persons with low and high serum interleukin-6 (IL-6) levels." J Am Geriatr Soc **48**(11): 1404-1407.
- Richter C. *et al.* (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proc. Natl. Acad. Sci. **85**: 6465-6467.
- Rockwood K. (2005). "What would make a definition of frailty successful?" Age Ageing **34**(5): 432-434.
- Rockwood K. *et al.* (2000). "Conceptualisation and measurement of frailty in elderly people." Drugs Aging **17**(4): 295-302.
- Rockwood K. and Mitnitski A. (2007). "Frailty in relation to the accumulation of deficits." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **62**(7): 722-727.
- Rockwood K. *et al.* (2008). "Apolipoprotein E-polymorphism, frailty and mortality in older adults." J Cell Mol Med **12**(6B): 2754-2761.
- Rockwood K. *et al.* (2005). "A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people." CMAJ **173**(5): 489-495.
- Rockwood K. *et al.* (1999). "A brief clinical instrument to classify frailty in elderly people." Lancet **353**(9148): 205-206.
- Rodriguez-Mañas L. *et al.* (2013). "Searching for an operational definition of frailty: a Delphi method based consensus statement: the frailty operative definition-consensus conference project." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **68**(1): 62-67.
- Rodriguez M.I. *et al.* (2007). "Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice." Free Radic Res **41**(1): 15-24.

- Rosenfeld R.D. *et al.* (1995). "Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum." Protein Expr Purif **6**(4): 465-471.
- Roubenoff R. (2000). "Sarcopenia: a major modifiable cause of frailty in the elderly." J Nutr Health Aging **4**(3): 140-142.
- Rowe J.W. and Kahn R.L. (1997). "Successful aging." Gerontologist **37**(4): 433-440.
- Rubenstein L.Z. (1987). "Geriatric assessment: an overview of its impacts." Clin Geriatr Med **3**(1): 1-15.
- Ruggiero C. and Ferrucci L. (2006). "The endeavor of high maintenance homeostasis: resting metabolic rate and the legacy of longevity." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **61**(5): 466-471.
- Sadowska-Bartosz I. and Bartosz G. (2014). "Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity." Biomed Res Int **2014**: 404680.
- Salmon A.B. *et al.* (2010). "Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?" Free Radic Biol Med **48**(5): 642-655.
- Samper-Ternent R. *et al.* (2011). "Frailty as a Predictor of Falls in Older Mexican Americans." J Aging Health.
- Sastre J. *et al.* (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration." Am. J. Physiol. **263**: R992-R995.
- Sastre J. *et al.* (1998). "A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress." Free Radic Biol Med **24**(2): 298-304.
- Sastre J. *et al.* (1996). "Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes." Hepatology **24**(5): 1199-1205.
- Sauna Z.E. and Kimchi-Sarfaty C. (2011). "Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease." Nat Rev Genet **12**(10): 683-691.

Bibliografía

- Schalk B.W. *et al.* (2004). "Lower levels of serum albumin and total cholesterol and future decline in functional performance in older persons: the Longitudinal Aging Study Amsterdam." Age Ageing **33**(3): 266-272.
- Schlernitzauer A. *et al.* (2013). "Chicoric acid is an antioxidant molecule that stimulates AMP kinase pathway in L6 myotubes and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." PLoS One **8**(11): e78788.
- Schuit A.J. *et al.* (1997). "Validity of the Physical Activity Scale for the Elderly (PASE): according to energy expenditure assessed by the doubly labeled water method." J Clin Epidemiol **50**(5): 541-546.
- Semba R.D. *et al.* (2007). "Oxidative stress and severe walking disability among older women." Am J Med **120**(12): 1084-1089.
- Serviddio G. *et al.* (2009). "Frailty syndrome is associated with altered circulating redox balance and increased markers of oxidative stress." Int J Immunopathol Pharmacol **22**(3): 819-827.
- Sevanian A. *et al.* (1985). "Conservation of vitamin C by uric acid in blood." J Free Radic Biol Med **1**(2): 117-124.
- Shamliyan T. *et al.* (2013). "Association of frailty with survival: a systematic literature review." Ageing Res Rev **12**(2): 719-736.
- Shardell M. *et al.* (2012). "Serum 25-hydroxyvitamin d, transitions between frailty States, and mortality in older adults: the invecchiare in chianti study." J Am Geriatr Soc **60**(2): 256-264.
- Sharpless N.E. and DePinho R.A. (2007). "How stem cells age and why this makes us grow old." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 703-713.
- Shigenaga M.K. *et al.* (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 10771-10778.
- Sies H. (1983). Biochemistry of oxidative stress. Glutathione: storage, transport and turnover in mammals. Y. S., Higashi T. and Tateishi N., Japan Scientific Press, Tokyo and UNU. Science Press, Utrech.: 63-69.
- Sies H. (1985). Oxidative stress: Introductory remarks. Oxidative Stress. Sies H. London, Academic Press: 1-8.

- Sies H. (1986). "Biochemistry of oxidative stress." Angew. Chem. **25**: 1058-1071.
- Sies H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." Eur J Biochem **215**(2): 213-219.
- Simic M.G. and Taylor K.A. (1988). "Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms." Basic Life Sci **49**: 1-10.
- Sittler A. *et al.* (1998). "SH3GL3 associates with the Huntingtin exon 1 protein and promotes the formation of polyGln-containing protein aggregates." Mol Cell **2**(4): 427-436.
- Slater T.F. (1984). "Free radical mechanism in tissue injury." Biochem. J. **222**: 1-15.
- Sohal R.S. (1993). "The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status." Aging (Milano) **5**(1): 3-17.
- Sohal R.S. and Sohal B.H. (1991). "Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging." Mech Ageing Dev **57**(2): 187-202.
- Sohal R.S. *et al.* (1990). "Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species." Mech Ageing Dev **53**(3): 209-215.
- Stadelmann C. *et al.* (2002). "BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells?" Brain **125**(Pt 1): 75-85.
- Stadtman E.R. (1992). "Protein oxidation and aging." Science **257**: 1220-1224.
- Stadtman E.R. (1992). "Protein oxidation and aging." Science **257**(5074): 1220-1224.
- Strawbridge W.J. *et al.* (1998). "Antecedents of frailty over three decades in an older cohort." J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci **53**(1): S9-16.
- Strehler B.L. (1985). "Aging: a challenge to science, society, and the individual." Clin Geriatr Med **1**(1): 5-13.
- Suh Y. and Vijg J. (2005). "SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes." Mutat Res **573**(1-2): 41-53.
- Szanton S.L. *et al.* (2009). "Allostatic load and frailty in the women's health and aging studies." Biol Res Nurs **10**(3): 248-256.

Bibliografía

- Tafesse F.G. *et al.* (2007). "Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells." J Biol Chem **282**(24): 17537-17547.
- Taylor B.S. *et al.* (1998). "Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene." J Biol Chem **273**(24): 15148-15156.
- Theou O. *et al.* (2011). "The effectiveness of exercise interventions for the management of frailty: a systematic review." J Aging Res **2011**: 569194.
- Tinetti M.E. *et al.* (1995). "Shared risk factors for falls, incontinence, and functional dependence. Unifying the approach to geriatric syndromes." JAMA **273**(17): 1348-1353.
- Travison T.G. *et al.* (2010). "Frailty, serum androgens, and the CAG repeat polymorphism: results from the Massachusetts Male Aging Study." J Clin Endocrinol Metab **95**(6): 2746-2754.
- Troen B.R. (2003). "The biology of aging." Mt Sinai J Med **70**(1): 3-22.
- Tsuchida A. *et al.* (2002). "Brain-derived neurotrophic factor ameliorates lipid metabolism in diabetic mice." Diabetes Obes Metab **4**(4): 262-269.
- Vaughan S. *et al.* (2014). "The effects of multimodal exercise on cognitive and physical functioning and brain-derived neurotrophic factor in older women: a randomised controlled trial." Age Ageing.
- Vellas B.J. *et al.* (1997). "One-leg balance is an important predictor of injurious falls in older persons." J Am Geriatr Soc **45**(6): 735-738.
- Viña J. *et al.* (2013). "The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging." Antioxid Redox Signal **19**(8): 779-787.
- Viña J. *et al.* (2007). "Theories of ageing." IUBMB Life **59**(4-5): 249-254.
- Viña J. *et al.* (1992). "Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants." Exs **62**: 136-144.

- Walston J. *et al.* (2005). "IL-6 gene variation is not associated with increased serum levels of IL-6, muscle, weakness, or frailty in older women." Exp Gerontol **40**(4): 344-352.
- Walston J. *et al.* (2008). "The physical and biological characterization of a frail mouse model." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **63**(4): 391-398.
- Walston J. and Fried L.P. (1999). "Frailty and the older man." Med Clin North Am **83**(5): 1173-1194.
- Walston J. *et al.* (2006). "Research agenda for frailty in older adults: toward a better understanding of physiology and etiology: summary from the American Geriatrics Society/National Institute on Aging Research Conference on Frailty in Older Adults." J Am Geriatr Soc **54**(6): 991-1001.
- Walston J. *et al.* (2002). "Frailty and activation of the inflammation and coagulation systems with and without clinical comorbidities: results from the Cardiovascular Health Study." Arch Intern Med **162**(20): 2333-2341.
- Walston J. *et al.* (2006). "Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women." Am J Epidemiol **163**(1): 18-26.
- Wei R.R. *et al.* (2012). "Identification of ADH4 as a novel and potential prognostic marker in hepatocellular carcinoma." Med Oncol **29**(4): 2737-2743.
- Welter D. *et al.* (2014). "The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D1001-1006.
- Whitson H.E. *et al.* (2007). "Frailty thy name is ... Phrailty?" J Gerontol A Biol Sci Med Sci **62**(7): 728-730.
- Wickens A.P. (2001). "Ageing and the free radical theory." Respir Physiol **128**(3): 379-391.
- Wilhelm-Leen E.R. *et al.* (2010). "Vitamin D deficiency and frailty in older Americans." J Intern Med **268**(2): 171-180.
- Wong S.H. *et al.* (1987). "Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct." Clin Chem **33**(2 Pt 1): 214-220.

Bibliografía

- Wood C.S. *et al.* (2009). "PtdIns4P recognition by Vps74/GOLPH3 links PtdIns 4-kinase signaling to retrograde Golgi trafficking." J Cell Biol **187**(7): 967-975.
- Woods N.F. *et al.* (2005). "Frailty: emergence and consequences in women aged 65 and older in the Women's Health Initiative Observational Study." J Am Geriatr Soc **53**(8): 1321-1330.
- Wu A. *et al.* (2004). "The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition." Eur J Neurosci **19**(7): 1699-1707.
- Wu I.C. *et al.* (2009). "High oxidative stress is correlated with frailty in elderly chinese." J Am Geriatr Soc **57**(9): 1666-1671.
- Xu C. *et al.* (2013). "BCL9 and C9orf5 are associated with negative symptoms in schizophrenia: meta-analysis of two genome-wide association studies." PLoS One **8**(1): e51674.
- Xue Q.L. (2011). "The frailty syndrome: definition and natural history." Clin Geriatr Med **27**(1): 1-15.
- Yamada K. and Nabeshima T. (2003). "Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes." J Pharmacol Sci **91**(4): 267-270.
- Yamamoto Y. and Gaynor R.B. (2001). "Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer." J Clin Invest **107**(2): 135-142.
- Yoshihara A. *et al.* (2009). "Physical function is weakly associated with angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism in elderly Japanese subjects." Gerontology **55**(4): 387-392.
- Zenhom M. *et al.* (2012). "Peptidoglycan recognition protein 3 (PglyRP3) has an anti-inflammatory role in intestinal epithelial cells." Immunobiology **217**(4): 412-419.
- Zhang Y. and Herman B. (2002). "Apoptosis and successful aging." Mech Ageing Dev **123**(6): 563-565.

Zoladz J.A.and Pilc A. (2010). "The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies." J Physiol Pharmacol **61**(5): 533-541.

Zuliani G. *et al.* (2004). "Combined measurement of serum albumin and high-density lipoprotein cholesterol strongly predicts mortality in frail older nursing-home residents." Aging Clin Exp Res **16**(6): 472-475.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1: ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

TÉRMINOS EN CASTELLANO		ENGLISH TERMS	
A	Adenina	A	Adenine
Abs	Absorbancia	Abs	Absorbance
ABVD	Actividades básicas de la vida diaria	ADL	Basic activities of daily living
ADN	Ácido desoxirribonucleico	DNA	Deoxyribonucleic acid
AIVD	Actividades instrumentales de la vida diaria	IADL	Instrumental activities of daily living
ANOVA	Análisis de la varianza	ANOVA	Analysis of variance
ARN	Ácido Ribonucleico	RNA	Ribonucleic acid
ATP	Adenosín-5'-trifosfato	ATP	Adenosin-5'-triphosphate
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro	BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Suero bovino albúmina	BSA	Bovine serum albumin
C	Citosina	C	Cytosine
°C	Grados centígrados		Degrees centigrade
cc	Centímetros cúbicos		cubic centimeters
CES-D	Escala de depresión del Centro de estudios epidemiológicos	CES-D	Center for Epidemiologic Studies Depression Scale
CHS	Estudio de la salud cardiovascular	CHS	Cardiovascular Health Study
CSHA	Estudio canadiense de salud y envejecimiento	CSHA	Canadian Study of Health and Aging
Cu,Zn-SOD	Cu/Zn Superóxido dismutasa	Cu,Zn-SOD	Cu/Zn Superoxide dismutase
DE	Desviación estándar	SD	Standard deviation
DEXA	Absorbimetría de rayos X de energía dual	DEXA	Dual-energy x-ray absorptiometry
DHEA	Dehidroepiandrosterona	DHEA	Dehydroepiandrosterone
DHEA-S	Dehidroepiandrosterona sulfato	DHEA-S	Dehydroepiandrosterone sulfate
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina	DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazine

EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético	EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ETES	Estudio Toledo para un Envejecimiento Saludable	ETES	Toledo Study for Healthy Ageing
g	Gramo/ Gravedades	g	Gram /gravities
G	Guanina	G	Guanine
GH	Hormona de crecimiento	GH	Growth hormone
GPx	Glutación peroxidasa	GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutación reducido	GSH	Reduced Glutathione
GSSG	Glutación oxidado	GSSG	Oxidized glutathione
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo	GWAS	Genome-wide association study
HCl	Ácido clorhídrico	HCl	Chloride acid
HDL	Lipoproteínas de alta densidad	HDL	High density lipoproteins
HNE	4-Hidroxi-2,3-nonenal	HNE	4-Hidroxi-2,3-nonenal
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	H₂O₂	Hydrogen peroxide
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución	HPLC	High-performance liquid chromatography
IECAs	Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina	ACEi	Angiotensin converting enzyme inhibitors
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1	IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleuquina	IL	Interleukine
IMC	Índice de masa corporal	BMI	Body Mass Index
INE	Instituto Nacional de Estadística	NSI	National Statistics Institute
Kg	Kilogramo	Kg	Kilogram
K₂HPO₄	Hidrogenofosfato potásico	K₂HPO₄	Potassium hydrogen phosphate
KH₂PO₄	Dihidrogenofosfato potásico	KH₂PO₄	Potassium dihydrogen phosphate
KOH	Hidróxido potásico	KOH	Potassium hydroxide
LDL	Lipoproteína de alta densidad	LDL	Low density lipoprotein

M	Molar	M	Molar
m	Metro	m	Meter
mA	Miliamperio	mA	Miliamper
MAF	Frecuencia del alelo menor	MAF	Minor allele frequency
MDA	Malondialdehído	MDA	Malondialdehyde
mg	Miligramo	mg	Miligram
mL	Mililitro	mL	Mililiter
mM	Milimolar	mM	Milimolar
MMSE	Mini-Mental State Examination	MMSE	Mini-Mental State Examination
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa	MnSOD	Manganese Superoxide Dismutase
n	Número muestral	n	Sample number
NADH	Nicotiamida adenina dinucleótido reducido	NADH	Reduced Nicotine Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato reducido	NADPH	Reduced Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH	Hidróxido de sodio	NaOH	Sodium hydroxide
NFkB	Factor nuclear kappa B	NFkB	Nuclear factor kappa B
NGF	Factor de crecimiento nervioso	NGF	Nerve growth factor
NIH	Instituto Nacional de Salud	NIH	National Institute of Health
nM	Nanomolar	nM	Nanomolar
NT	Neurotrofina	NT	Neurotrophin
¹O₂	Oxígeno singlete		Singlet oxygen
8-oxodG	8-Hidroxi-2'desoxi guanosina	8-oxodG	8 -Hydroxy-2-deoxyGuanosine
OMS	Organización mundial de la salud	WHO	World health organization
OSE	Observatorio de sostenibilidad de España	OSE	Spanish Sustainability Observatory
PASE	Physical activity scale for the elderly"	PASE	Physical activity scale for the elderly
PBS	Fosfato tampón salino	PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Fosfato tampón salino+Tween	PBS-T	Phosphate buffered saline+Tween
PCA	Ácido perclórico	PCA	Perchloric acid

PCR	Proteína C reactiva	CRP	C-Reactive protein
pg	Picogram	pg	Picogram
PVDF	Polifluoruro de vinilideno	PVDF	Polivinil difluoride
RETICEF	Red Temática de Investigación en Envejecimiento y Fragilidad	RETICEF	Network for Research in Ageing and Frailty
RNS	Especies reactivas del nitrógeno	RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Especies reactivas del oxígeno	ROS	Reactive oxygen species
rpm	revoluciones por minuto	rpm	Revolutions per minute
rs	SNP de referencia	rs	Reference SNP
SDS	Dodecil sulfato sódico	SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEMEG	Sociedad Española de Medicina Geriátrica	SEMEG	Spanish Society for Geriatric Medicine
SESCAM	Servicio de Salud de Castilla la Mancha	SESCAM	Castilla la Mancha Health Service
SKAT	Sequence Kernel Association Test	SKAT	Sequence Kernel Association Test
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOD	Superóxido dismutasa	SOD	Superoxide dismutase
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico	TBA	Thio-barbituric acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	TEMED	Tetramethylethylenediamine
T	Timina	T	Thymine
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina	TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa	TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TRIS	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol	TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
Trk	Tirosín quinasa	Trk	Tyrosine kinase
u.a.	Unidades arbitrarias	a.u.	Arbitrary units
UPE	Unidades de Primera Etapa	UPE	First stage units
UTR	Región no traducida	UTR	Untranslated region

VGI	Valoración geriátrica integral	CGA	Comprehensive geriatric assessment
v/v	Volumen/volumen	v/v	Volume/ volume
μL	microlitro	μL	microliter
μm	micrometro	μm	micrometer
λ	longitud de onda	λ	wavelength
χ²	Chi cuadrado	χ²	Chi Square test

8.2. ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO



Consejería de
Sanidad

ESTUDIO TOLEDO DE ENVEJECIMIENTO SALUDABLE Consentimiento Informado



Nombre:

Apellidos:

En calidad de interesado/ Tutor del interesado

Nombre (del interesado):

Apellidos:

He leído la hoja de información del Estudio Toledo de Envejecimiento y doy mi consentimiento para colaborar con el estudio en los siguientes puntos:

1. Realización de las entrevistas.
2. Para utilizar las bases de datos administrativas relacionadas con mis procesos de salud y para la revisión de mi historial clínico.
3. Para que me extraigan muestras de sangre, se analicen y se almacenen.

..... a..... de..... de

Dirección General de
Salud Pública y Participación

Avda. de Francia 4 - TOLEDO



Consejería de
Sanidad

ESTUDIO TOLEDO DE ENVEJECIMIENTO SALUDABLE

Hoja de Información



A continuación vamos a hacer una descripción del estudio para que tenga una idea clara de lo que significará la colaboración para usted.

El Estudio Toledo de Envejecimiento lo llevan a cabo investigadores de la Consejería de Sanidad y del Hospital Virgen del Valle de Toledo, con amplia experiencia de la investigación de poblaciones mayores. El estudio ha sido avalado científicamente por la Sociedad Española de Medicina Geriátrica y ha pasado la evaluación de Fondo de Investigaciones Sanitarias de Ministerio de Sanidad y Consumo y del Instituto de Ciencias de la Salud de la Junta de Comunidades de Castilla la Mancha consiguiendo subvenciones de ambas entidades.

El estudio consta de dos entrevistas que **se pasarán en su propio domicilio** en días diferentes y un seguimiento de su relación con el sistema de salud:

La primera entrevista será llevada a cabo por psicólogos licenciados quienes solicitarán información acerca de sus datos de salud (datos sociodemográficos, situación funcional, situación social, estado de ánimo, nivel cognitivo, calidad de vida, hábitos nutricionales, antecedentes de salud personales y familiares).

La segunda entrevista la realizarán enfermeras y fisioterapeutas diplomadas quienes medirán su altura, peso, frecuencia cardiaca, le tomarán la tensión arterial, electrocardiograma, evaluarán su respiración, medirán su fuerza, equilibrio y por último analizarán su marcha y actividad física. Finalmente si usted quiere le realizarán un análisis de sangre.

Su relación con el sistema de salud se evaluará – si usted nos otorga el permiso – analizando las bases de datos administrativas de ingresos hospitalarios, frecuentación de consultas, consumo de fármacos e ingresos en residencias.

Finalmente, las entrevistas se repetirán cada 2-3 años con el fin de evaluar cambios en su estado de salud.

Fines de las muestras de sangre:

La sangre extraída nos servirá para determinar indicadores nutricionales (proteínas, vitaminas, colesterol), otras pruebas relacionadas con problemas inflamatorios crónicos y en general indicadores relacionados con el envejecimiento saludable. Una parte de las muestras será almacenada para realizar determinaciones futuras, siempre relacionadas con factores biológicos o genéticos implicados en el envejecimiento. Los resultados de los análisis no le serán comunicados a no ser que usted se muestre interesado por ellos.

Dirección General de
Salud Pública y Participación

Avda. de Francia 4 - TOLEDO



Consejería de
Sanidad

Confidencialidad:

Toda la información que usted nos proporcione así como los resultados de los análisis de sangre serán totalmente confidenciales. Tanto el archivo de datos como las muestras sanguíneas estarán encriptadas, es decir su nombre y apellidos serán sustituidos por una clave (serie de números) que mantendrán su anonimato. Sus datos personales y la clave que los identifica, será debidamente custodiados por el investigador principal del proyecto o por quien decida la autoridad sanitaria. En todo momento usted tendrá el derecho a retirar.

Otros aspectos éticos:

Su participación en el proyecto es totalmente altruista, es decir no podrán recibir ninguna compensación económica de los resultados de las posibles patentes que se puedan derivar del estudio. En contraprestación a su esfuerzo el equipo investigador renuncia en favor del sistema público de salud a la posibles beneficios económicos que pudieran derivarse de dichas patentes

Dirección General de
Salud Pública y Participación

Avda. de Francia 4 - TOLEDO

8.3. ANEXO 3: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA

COMPLEJO HOSPITALARIO DE TOLEDO
HOSPITAL VIRGEN DE LA SALUD
Avda. Barber, 30. 45004. Toledo. Teléfono 925 269200



C.E.I.C. VALIDA
FECHA: 13/07/2012
N.º 42

DICTAMEN DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA


D. Fernando Jiménez Torres, Secretario del Comité Ético de Investigación clínica del "Complejo Hospitalario de Toledo".

CERTIFICA:

Que este Comité, ha evaluado la documentación presentada con las modificaciones solicitadas con fecha 13 de junio de 2012 de la Documentación Adicional al Estudio: "ESTUDIO TOLEDO DE ENVEJECIMIENTO". Inv. principal: Dr. García García, Sº, de Geriatria. H. Virgen del Valle, y considera que:

El CEIC aprueba el estudio.

Lo que firmo en Toledo, 27 de junio de 2012.


 COMPLEJO HOSPITALARIO
 DE TOLEDO
 COMITÉ ETICO DE
 INVESTIGACION CLINICA
 Fdo: Fernando Jiménez Torres

COMPLEJO HOSPITALARIO DE TOLEDO
HOSPITAL VIRGEN DE LA SALUD
Avda. Barber, 30. 45004. Toledo. Teléfono 925 269200

CEIC. CALIDA
FECHA: 15/07/10
N.º 43



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

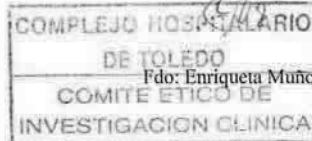
Doña Enriqueta Muñoz Platón, Secretaria del Comité Ético de Investigación clínica del "Complejo Hospitalario de Toledo".

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado el Proyecto de Investigación.: "PREDICTORES DE FRAGILIDAD, DISCAPACIDAD, DETERIORO COGNITIVO, EVENTOS VASCULARES, HOSPITALIZACION Y MORTALIDAD DE UNA COHORTE DE MAYORES DE 64 AÑOS. ESTUDIO TOLEDO PARA ENVEJECIMIENTO SALUDABLE". Investigadores principales: **Dr. Fco. Jose García García** y **Dra. Ana Alfaro Acha**. Geriatria. H.V.V., y considera que:

El CEIC aprueba este proyecto.

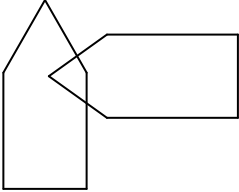
Lo que firmo en Toledo, a 14 de julio de 2010.



COMPLEJO HOSPITALARIO
DE TOLEDO
COMITÉ ÉTICO DE
INVESTIGACION CLINICA

Fdo: Enriqueta Muñoz Platón

8.4. ANEXO 4: MMSE

Orientación		
• Dígame el día.....fecha.....mes.....estación.....año.....	5	
• Dígame el centro.....piso.....ciudad.....provincia.....nación.....	5	
Registro		
• Repita estas 3 palabras: “caballo”, “peseta”, “manzana”	3	
Concentración y cálculo		
• Si tiene 30 pesetas y me las da de 3 en 3, ¿cuántas le van quedando?	5	
• Repita estos tres números : 5,9,2 (hasta que los aprenda) .Ahora hacia atrás	3	
Memoria		
• ¿Recuerda las tres palabras de antes? Caballo, Manzana	3	
Lenguaje y Construcción		
• Mostrar un bolígrafo. ¿Qué es esto ?, repetirlo con un reloj	2	
• Repita esta frase : En un trigal había cinco perros	1	
• Una manzana y una pera son frutas ¿verdad? qué son el rojo y el verde?colores	1	
• ¿Que son un perro y un gato?animales	1	
• Coja este papel con la mano derecha dóblelo y póngalo encima de la mesa	3	
• Lea esto y haga lo que dice : CIERRE LOS OJOS	1	
• Escriba una frase	1	
• Copie este dibujo	1	
		

Puntuación:

25-30	Normal. La persona presenta una adecuada capacidad cognoscitiva
24-21	Deterioro cognitivo leve
20-10	Deterioro cognitivo moderado
<10	Deterioro cognitivo severo

8.5. ANEXO 5: CRITERIOS DE FRAGILIDAD DE FRIED

	NO	SÍ
1. Pérdida de peso involuntaria ¿Ha perdido más de 4 kilos y medio de peso de forma involuntaria en el último año?		
2. Estado de ánimo decaído En la última semana ¿cuántos días ha sentido que todo lo que hacía era un esfuerzo? En la última semana ¿cuántas veces no ha tenido ganas de hacer nada?	Raramente (<1 día) <input type="checkbox"/>	Pocas veces (1-2 días) <input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	Ocasionalmente (3-4 días) <input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	La mayor parte del tiempo (5-7 días) <input type="checkbox"/>
3. Velocidad de la marcha Según la altura y sexo ¿el paciente tarda igual o más de lo indicado en caminar 4,6 m?		
Altura Tiempo ♂ ≤ 173cm..... ≥ 7 s > 173cm..... ≥ 6 s ♀ ≤ 159cm..... ≥ 7 s > 159cm..... ≥ 6 s	NO	SÍ
4. Actividad física El paciente realiza semanalmente menos o igual de la actividad física indicada?	NO	SÍ
♂ :<383 kcal/semana (pasear ≤ 2:30horas/semana) ♀ :<270 kcal/semana (pasear ≤2 horas/semana)		
5. Debilidad muscular Según el índice de masa corporal y sexo ¿la fuerza de prensión de la mano es menor o igual a la indicada?	NO	SÍ
IMC ♂ DIM IMC ♀ DIM < 24:..... ≤29 kg <23:..... ≤17 kg 24.1-26:..... ≤30 kg 23.1-26:..... ≤17.3 kg 26.1-28:..... ≤30 kg 26.1-29:..... ≤18 kg >28:..... ≤32 kg >29:..... ≤ 21 kg		
IMC: Índice de masa corporal DIM: Dinamometría manual		
Diagnóstico de fragilidad: si el paciente cumple 3 o más criterios. Diagnóstico de prefragilidad: si el paciente cumple 2 criterios.		

Criterios de L. Fried para identificar la fragilidad^{1,2}.

1- Fried L et al. "Frailty in Older Adults: Evidence for a Phenotype". J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2001;56(3): M146-M156. 2- Fried LP, Ferrucci L, Darer J, Williamson JD, Anderson G. "Untangling the concepts of disability, frailty, and comorbidity: implications for improved targeting and care". J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2004;59:255-63.

8.6. ANEXO 6: ESCALA PASE

PASE 1. En los últimos siete días, ¿Cuánto participó en las actividades en las que debía de permanecer sentado, tales como la lectura, ver la TV o jugar a las cartas?

1. Nunca
2. Raras veces (1 o 2 días)
3. Algunas veces (3 o 4 días)
4. A menudo (5 a 7 días)

- **Pase 1a.** ¿Cuáles fueron esas actividades? ANOTAR EN EL PAPEL U ORDENADOR
- **Pase1b.** Sólo contestar si en PASE1 hace alguna actividad). De media, ¿Cuántas horas al día pasa sentado haciendo esas actividades?
 1. Menos de una hora
 2. Más de 1 hora pero menos de 2 horas
 3. De 2 a 4 horas
 4. Más de 4 horas

PASE 2. En los últimos siete días, ¿Con que frecuencia camino fuera de su casa o de su patio por cualquier razón. Por ejemplo, por diversión, o para hacer ejercicio, para caminar hacia el trabajo, pasear al perro, etc?

1. Nunca (1 o 2 días)
2. Raras veces (1 o 2 días)
3. Algunas veces (3 o 4 días)
4. A menudo (5 a 7 días)

- **Pase 2a.** Sólo si caminó fuera de casa en PASE2. De media, ¿Cuántas horas al día pasa caminando?
 1. Menos de una hora
 2. Más de 1 hora pero menos de 2 horas
 3. De 2 a 4 horas
 4. Más de 4 horas

PASE 3. En los últimos siete días, ¿Con qué frecuencia practica deportes ligeros o actividades de recreo, tales como bolos, golf (con coche), partidas de cartas, pescar desde una lancha u otras actividades similares?

1. Nunca
2. Raras veces (1 o 2 días)
3. Algunas veces (3 o 4 días)
4. A menudo (5 a 7 días)

- **Pase3 a.** ¿Cuáles fueron esas actividades? ANOTAR EN EL PAPEL U ORDENADOR

PASE 3b. Sólo si en PASE3 hace alguna actividad. De media ¿Cuántas horas al día pasa haciendo esas actividades?

1. Menos de una hora
2. Más de 1 hora pero menos de 2 horas
3. De 2 a 4 horas
4. Más de 4 horas

PASE 4. En los últimos siete días, ¿Con que frecuencia realiza deportes moderados o actividades de recreo tales como dobles de tenis, danza con balón, caza, golf sin coche, fútbol, u otras actividades similares?

1. Nunca
2. Raras veces (1 o 2 días)
3. Algunas veces (3 o 4 días)
4. A menudo (5 a 7 días)

- **Pase 4a.** ¿Cuáles fueron esas actividades? ANOTAR EN EL PAPEL U ORDENADOR

- **Pase 4b.** Sólo si en PASE4 hace alguna actividad. De media ¿Cuántas horas al día pasa haciendo esas actividades?

1. Menos de una hora
2. Más de 1 hora pero menos de 2 horas
3. De 2 a 4 horas
4. Más de 4 horas

PASE 5. En los últimos siete días, ¿Con que frecuencia realiza deportes extenuantes o actividades de recreo tales como ciclismo, natación, tenis simples, aerobico, jogging, esqui u otras actividades similares?

1. Nunca
2. Raras veces (1 o 2 días)
3. Algunas veces (3 o 4 días)
4. A menudo (5 a 7 días)

- **Pase 6a.** ¿Cuáles fueron estas actividades? ANOTAR EN HOJA U ORDENADOR

- **Pase 6b.** Sólo si realiza deportes moderados. De media, ¿Cuántas horas al día pasa realizando esas actividades?

1. Menos de una hora
2. Más de 1 hora pero menos de 2 horas
3. De 2 a 4 horas
4. Más de 4 horas

PASE 6. En los últimos siete días, ¿Con que frecuencia realiza algún ejercicio dirigido específicamente a mejorar su fuerza muscular y resistencia, tal como levantamiento de peso o maquinas de fuerza, levantar cosas, etc.?

1. Nunca
2. Raras veces (1 o 2 días)
3. Algunas veces (3 o 4 días)
4. A menudo (5 a 7 días)

- **Pase 6a.** ¿Cuáles fueron estas actividades? ANOTAR EN HOJA U ORDENADOR
- **Pase 6b.** Sólo si realiza deportes moderados. De media, ¿Cuántas horas al día pasa realizando esas actividades?
 1. Menos de una hora
 2. Más de 1 hora pero menos de 2 horas
 3. De 2 a 4 horas
 4. Más de 4 horas

PASE 7. En los últimos siete días, ¿Ha hecho algún trabajo doméstico ligero, como quitar el polvo o fregar los platos?

1. Sí 2. No 3. NS 4. NC

PASE 8. En los últimos siete días, ¿Ha hecho algún trabajo doméstico pesado o quehaceres tales como pasar el aspirador, fregar suelos, limpiar ventanas o transporte?

1. Sí 2. No 3. NS 4. NC

PASE 9. En los últimos siete días, ¿Ha realizado reparaciones domesticas como pintar, empapelar, reparaciones eléctricas, etc.?

1. Sí 2. No 3. NS 4. NC

PASE 10. En los últimos siete días, ¿Ha realizado usted actividades de mantenimiento del césped o cuidado del patio o del terreno, incluido la retirada de nieve o de las hojas, cortar leña, etc.?

1. Sí 2. No 3. NS 4. NC

PASE 11. En los últimos siete días, ¿Ha realizado usted actividades de jardinería exterior?

1. Sí 2. No 3. NS 4. NC

PASE12. En los últimos siete días, ¿Ha cuidado usted de otra persona, tal como un niño, cónyuge dependiente o de otro adulto?

1. Sí 2. No 3. NS 4. NC

PASE 13. Durante los pasados siete días ¿Trabajó por dinero o como voluntario?

1. Sí 2. No 3. NS 4. NC

Si contesta que Si en PASE13:

- **Pase 13a.** ¿Cuántas horas por semana trabaja por dinero y/o como voluntario? _

- **Pase 13b.** ¿Cuál de las siguientes categorías describe mejor la cantidad de actividad física que se necesita para su profesión y/o trabajo voluntario?
 1. Principalmente sentado, con ligeros movimientos de los brazos (por ejemplo, trabajo de oficina, conducir un autobús, relojero, trabajar sentado en una cadena)
 2. Sentado o de pie, con algún paseo (por ejemplo, cajero, trabajo en una oficina general, trabajo con maquinaria o con instrumentos ligeros)
 3. Caminando, con manejo de algunos materiales que generalmente pesan menos de 22 Kg. (por ejemplo, cartero, camarero/a, empleado de construcción, trabajos con maquinaria o instrumentos pesados)
 4. Caminando y trabajo manual pesado que a menudo requiere manejar materiales que pesan más de 22 Kg (por ejemplo, madero, albañil con piedra, granja)

8.7. ANEXO 7: ÍNDICE DE KATZ

Bañarse	<i>Independiente:</i> necesita ayuda para lavarse una sola parte (como la espalda o una extremidad incapacitada) o se baña completamente sin ayuda
	<i>Dependiente:</i> necesita ayuda para lavarse más de una parte del cuerpo, para salir o entrar en la bañera, o no se lava solo
Vestirse	<i>Independiente:</i> coge la ropa solo, se la pone, se pone adornos y abrigos y usa cremalleras (se excluye el atarse los zapatos).
	<i>Dependiente:</i> no se viste solo o permanece vestido parcialmente
Usar el retrete	<i>Independiente:</i> accede al retrete, entra y sale de él, se limpia los órganos excretores y se arregla la ropa (puede usar o no soportes mecánicos).
	<i>Dependiente:</i> usa orinal o cuña o precisa ayuda para acceder al retrete y utilizarlo.
Movilidad	<i>Independiente:</i> entra y sale de la cama y se sienta y levanta de la silla solo (puede usar o no soportes mecánicos).
	<i>Dependiente:</i> precisa de ayuda para utilizar la cama y/o la silla; no realiza uno o más desplazamientos
Continencia	<i>Independiente:</i> control completo de micción y defecación
	<i>Dependiente:</i> incontinencia urinaria o fecal parcial o total.
Alimentación	<i>Independiente:</i> lleva la comida desde el plato o su equivalente a la boca (se excluyen cortar la carne y untar la mantequilla o similar).
	<i>Dependiente:</i> precisa ayuda para la acción de alimentarse, o necesita de alimentación enteral o parenteral.

Puntuación cualitativa:

A	Independiente en alimentación, continencia, movilidad, uso del retrete, vestirse y bañarse.
B	Independiente para todas las funciones anteriores excepto una
C	Independiente para todas excepto bañarse y otra función adicional.
D	Independiente para todas excepto bañarse, vestirse y otra función adicional
E	Independiente para todas excepto bañarse, vestirse, uso del retrete y otra función adicional
F	Independiente para todas excepto bañarse, vestirse, uso del retrete, movilidad y otra función adicional.
G	Dependiente en las seis funciones.
H	Dependiente en al menos dos funciones, pero no clasificable como C, D, E o F .

Puntuación cualitativa (la utilizada en el presente trabajo)

0	Dependiente en las 6 funciones
1	Dependiente en 5 funciones.
2	Dependiente en 4 funciones
3	Dependiente en 3 funciones.
4	Dependiente en 2 funciones
5	Dependiente en 1 función
6	Independiente en todas las funciones

8.8. ANEXO 8: ÍNDICE DE LAWTON Y BRODY

Uso del teléfono:	
• Utiliza el teléfono por iniciativa propia	
• Es capaz de marcar bien algunos números familiares	
• Es capaz de contestar al teléfono, pero no de marcar	
• No es capaz de usar el teléfono	
Ir de compras	
• Realiza todas las compras necesarias independientemente	
• Realiza independientemente pequeñas compras	
• Necesita ir acompañado para hacer cualquier compra	
• Totalmente incapaz de comprar	
Preparación de la comida	
• Organiza, prepara y sirve las comidas por sí solo adecuadamente	
• Prepara adecuadamente las comidas si se le proporcionan los ingredientes	
• Prepara, calienta y sirve las comidas, pero no sigue una dieta adecuada	
• Necesita que le preparen y sirvan las comidas	
Cuidado de la casa	
• Mantiene la casa solo o con ayuda ocasional (para trabajos pesados)	
• Realiza tareas ligeras, como lavar los platos o hacer las camas	
• Realiza tareas ligeras, pero no puede mantener un adecuado nivel de limpieza	
• Necesita ayuda en todas las labores de la casa	
• No participa en ninguna labor de la casa	
Lavado de la ropa	
• Lava por sí solo toda su ropa	
• Lava por sí solo pequeñas prendas	
• Todo el lavado de ropa debe ser realizado por otro	
Uso del transporte	
• Viaja solo en transporte público o conduce su propio coche	
• Es capaz de coger un taxi, pero no usa otro medio de transporte	
• Viaja en transporte público cuando va acompañado por otra persona	
• Sólo utiliza el taxi o el automóvil con ayuda de otros	
• No viaja	
Responsabilidad para la toma de medicamentos	
• Es capaz de tomar su medicación a la hora y con la dosis correcta	
• Toma su medicación si la dosis le es preparada previamente	
• No es capaz de administrarse su medicación	
Manejo del dinero	
• Se encarga de sus asuntos económicos por sí solo	
• Realiza las compras de cada día, pero necesita ayuda en las grandes compras, bancos	
• Incapaz de manejar dinero	

Puntuación:

8	Máxima independencia
0	Máxima dependencia

8.9. ANEXO 9: PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS SNPs RELACIONADOS CON LA FRAGILIDAD

SNP	Gen/ proteína	Cromo- soma	Localización	Función
rs11812479 (de riesgo)	Desconocido	10	Desconocida	Desconocida
rs10457204 (de riesgo)	FIG4 <i>Homolog, SAC1 lipid phosphatase domain containing (S. cerevisiae)</i>	6	Intrón	Elimina el fosfato 5 del anillo inositol del fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato (PI(3,5)P ₂), un fosfolípido de membrana que actúa como una señal molecular para el tráfico y la fusión de vesículas intracelulares. El déficit de FIG4 reduce los niveles de PI(3,5)P ₂ .
rs737154 (de riesgo)	SIC12A7 <i>Solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters)</i>	5	Exón sinónimo GTG ⇒ GTA V [Val] ⇒ V [Val]	Media el cotransporte de K-Cl. De esta manera, participa en movimientos transmembrana de sales, modula el potencial de membrana regulando el contenido iónico, y regula el volumen celular. Además, IGF 1 aumenta su expresión
rs16889283 (de riesgo)	AARD <i>Alanine And Arginine Rich Domain Containing Protein</i>	8	Exón no sinónimo GGC ⇒ AGC G [Gly] ⇒ S [Ser]	No se sabe la función. Se sobreexpresa durante el desarrollo de tejidos, tales como pulmón y testículos.
rs3773603 (protector)	CACNA2D3 <i>Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3</i>	3	Exón sinónimo GGA ⇒ GGG G [Gly] ⇒ G [Gly]	Puede regular numerosos procesos biológicos relacionados con el crecimiento celular en los que interviene el calcio, tales como la proliferación, motilidad, angiogénesis, resistencia a la apoptosis y regulación transcripcional.
rs3809430 (de riesgo)	FSCB <i>Fibrous sheath CABYR binding protein</i>	14	Exón sinónimo CCG ⇒ CCA P [Pro] ⇒ P [Pro]	Implicado en la capacitación e hiperactivación del espermatozoide.
rs7096031 (de riesgo)	OTUD1 <i>OTU domain containing 1</i>	10	Desconocida	Impide la acción de las ubiquitin-ligasas, regulando así diversas cascadas de señalización celular.

Anexos

rs4148883 (de riesgo)	ADH 4 alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	4	Intrón	Sus funciones incluyen: metabolismo del etanol, actividad frente a productos de la lipoperoxidación y los hidrosteroides, detoxificación de formaldehído endógeno y exógeno, homeostasis del óxido nítrico, contribución al metabolismo del retinol (actúa como retinol deshidrogenasa), y de la norepinefrina.
rs1126671 (de riesgo)			Exón no sinónimo ATT ⇒ GTT I [Ile] ⇒ V [Val]	
rs1126673 (de riesgo)			Exón no sinónimo GTC ⇒ ATC V [Val] ⇒ I [Ile]	
rs11208257 (de riesgo)	PGM1 phosphoglucomutase 1	1	Exón no sinónimo TAT ⇒ CAT Y [Tyr] ⇒ H [His]	Cataliza la interconversión de glucosa 1 fosfato (G1P) y glucosa 6 fosfato (G6P), convirtiéndose así en la enzima clave de unión entre la vía de la glicólisis y la gluconeogénesis.
rs613444 (protector)	NFIB nuclear factor I/B	9	Desconocida	Interviene en el desarrollo del pulmón y del cerebro.
rs1929860 (de riesgo)	CDC42BP A CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)	1	Exón no sinónimo GTA ⇒ ATA V [Val] ⇒ I [Ile]	Media la formación de actina periférica, y la reorganización del citoesqueleto.
rs11006229 (protector)	SGMS1 sphingomyelin synthase 1	10	UTR-5	Produce esfingomiélna, consumiendo ceramida (regulador negativo de la proliferación celular), y formando diacilglicerol (factor mitogénico). Por tanto, favorece la proliferación celular.
rs1387144 (de riesgo)	BDNF-AS BDNF antisense RNA (non-protein coding)	11	Intrón	Regula la expresión de BDNF, tanto del mRNA como de la proteína.

**8.10. ANEXO 10: ARTÍCULO RELACIONADO CON
LA PRESENTE TESIS DOCTORAL**

Oxidative Stress Is Related to Frailty, Not to Age or Sex, in a Geriatric Population: Lipid and Protein Oxidation as Biomarkers of Frailty

Marta Inglés, MS,* Juan Gambini, PhD,^{†‡} Jose A. Carnicero, PhD,[§] Francisco J. García-García, MD,[§] Leocadio Rodríguez-Mañas, MD,[¶] Gloria Olaso-González, PhD,^{†‡} Mar Dromant, MS,^{†‡} Consuelo Borrás, PhD,^{†‡} and Jose Viña, MD^{†‡}

OBJECTIVES: To ascertain whether indicators of oxidative damage to lipids (malondialdehyde (MDA)) and proteins (protein carbonylation) are biomarkers of frailty, after adjusting for age, sex, and other possible confounders.

DESIGN: Cross-sectional cohort study.

SETTING: Community.

PARTICIPANTS: Toledo Study for Healthy Aging participants (N = 742, aged 65–95), classified as frail (n = 54), prefrail (n = 278) and nonfrail (n = 410) according to the Fried criteria.

MEASUREMENTS: Blood plasma was obtained using centrifugation (1,500 G, 15 minutes) and immediately frozen at –80°C. Plasma lipid peroxidation was determined by measuring the MDA formed from lipoperoxides using high-performance liquid chromatography and protein carbonylation was measured using Western blot.

RESULTS: Age- and sex-adjusted levels of lipoperoxides (measured as MDA) and protein carbonylation in plasma proved to be related to frailty, even after including possible independent confounders.

CONCLUSION: Circulating oxidative damage biomarkers, such as MDA and protein carbonylation, are related to frailty and not to age or sex. These parameters may be considered as potential biomarkers of frailty in the context of a multidisciplinary health-promoting approach for older adults. *J Am Geriatr Soc* 2014.

Key words: elderly; frailty; biomarkers; oxidative damage

Age-associated frailty is a geriatric syndrome.^{1–3} Frail individuals are vulnerable and lack capacity to manage external stressors.⁴ Even if there is no consensus on the definition of frailty, this condition can lead to increasing disability, institutionalization, and even death.^{4,5} The most frequently employed criteria of frailty are those that Linda Fried and colleagues defined in 2001: involuntary weight loss, self-reported exhaustion, low physical activity, slowness, and low grip strength.⁴ Frailty has also been associated with being female or African American, having lower education or a lower socioeconomic status, and the presence of chronic diseases or disability.⁴

One of the most important features of frailty, from the medical point of view, is that it refers to a dynamic condition, which means that not all individuals are frail in the same way, and moreover, a frail individual can become nonfrail if frailty is detected and treated at the onset.⁶ Therefore, a great amount of attention has been focused on finding biomarkers to help in the diagnosis of frailty and to prevent adverse outcomes. In this regard, frailty has been linked to some inflammation-related biomarkers, such as tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and C-reactive protein.⁷ It has also been associated with oxidative stress markers, such as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine,⁸ ratio of glutathione disulfide to glutathione, malondialdehyde (MDA), and 4-hydroxy-2,3-nonenal in plasma,⁹ but these associations were not clearly established. The question of whether frailty is associated with oxidative stress has not been addressed in a large controlled human cohort, and this is the major aim of this article.

Frailty is associated with oxidative stress, independent of age, sex, and other potential confounders. Thus, oxidative stress markers may be useful in detecting

From the *Department of Physiotherapy, Faculty of Physiotherapy, University of Valencia; [†]Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia; [‡]Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario/INCLIVA, Valencia; [§]Division of Geriatric Medicine, Hospital Virgen del Valle, Complejo Hospitalario de Toledo, Toledo; and [¶]Fundación para la Investigación Biomédica, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, Spain.

Address correspondence to Professor Jose Viña, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibañez, 15, Valencia, E46010 Spain. E-mail: jose.vina@uv.es

DOI: 10.1111/jgs.12876

frailty, and this would make early detection and testing the efficacy of intervention aimed at treating frailty and preventing its progression to disability possible.

METHODS

Participants

A representative sample of 742 people was randomly selected from the Toledo Study for Healthy Aging, a longitudinal population-based cohort of 2,488 community-dwelling people from Toledo, Spain, aged 65 and older.¹⁰ The sample included 309 men (173 nonfrail, 118 prefrail, and 18 frail) and 433 women (237 nonfrail, 160 prefrail, and 36 frail). All participants provided informed consent on entering the study. Inclusion criteria were aged 65 and older and being registered in the last municipal census of the province of Toledo, Spain. The clinical research ethics committee of the Complejo Hospitalario de Toledo approved the study protocol.

After being recruited, subjects underwent a standardized assessment including several interviews at home by trained interviewers, usually nurses, and physical examinations. The first evaluation was performed between 2006 and 2009, and a second interview commenced in 2013 and will finish in 2014.

Physical activity levels were determined using the Physical Activity Scale for the Elderly (PASE), the comorbidity incidence using the Charlson Index, independence in activities of daily living using the Katz Index, and independence in instrumental activities of daily living using the Lawton Index. Cognitive status was assessed using the Mini-Mental State Examination and the Geriatric Depression Scale.

Sampling

Blood samples were collected from the antecubital vein and delivered immediately to the laboratory, where they were processed for routine clinical chemistry assays. (Plasma was obtained using centrifugation with ethylenediaminetetraacetic acid and serum using centrifugation with no anticoagulant (1,500 G, 15 minutes).) Plasma and serum aliquots were then frozen and stored at -80°C until the time of analysis. Interviewers, physical examiners, and laboratory personnel were all blinded to the frailty status of the subjects.

Frailty Status

Frailty status was determined according to the concept of the frailty syndrome proposed in the Cardiovascular Health Study.⁴ Briefly, a subject was considered frail if he or she tested positive for three or more of the following five criteria: weight loss, self-reported exhaustion, weak grip strength, slow walking speed, and low physical activity. Subjects meeting one or two of the criteria were considered prefrail, and those meeting none were considered nonfrail. Weight loss was defined as an unintentional loss of 4.5 kg or more during the last year. Self-reported exhaustion was assessed by answering two questions from the Center for Epidemiologic Studies Depression Scale:¹¹

“I felt that anything I did was a big effort,” and “I felt that I could not keep on doing things.” Grip strength was measured using a hydraulic dynamometer, and walking speed was determined using a 3-m walking speed test, adjusted for gender and height.¹² Low physical activity was defined as the worst quintile of PASE scores.¹³

Lipid Peroxidation Measured Using High-Performance Liquid Chromatography

Plasma lipid peroxidation was determined as MDA levels, which were detected using high-performance liquid chromatography (HPLC) as an MDA–thiobarbituric acid (TBA) adduct following a method described previously.¹⁴ This method is based on the hydrolysis of lipoperoxides in plasma and subsequent formation of an adduct between TBA and MDA (TBA–MDA₂). This adduct was detected using HPLC in reverse phase and quantified at 532 nm. The chromatographic technique was performed under isocratic conditions, the mobile phase being a mixture of monopotassium phosphate 50 mM (pH 6.8) and acetonitrile (70:30).

Protein Carbonylation Measured Using Western Blotting

The carbonyl groups in the protein side chains were derivatized to 2,4-dinitrophenylhydrazone by reacting with 2,4-dinitrophenylhydrazine so that they could be detected using Western blotting using specific antibodies. Oxidative modification of total proteins was assessed by immunoblot detection of plasma protein carbonyl groups using the OxyBlot Protein Oxidation Detection kit in accordance with the manufacturer's instructions (Millipore, Billerica, MA). The procedure to quantify total protein carbonyls using the OxyBlot kit was densitometry of the Oxyblot and Ponceau staining followed by finding the ratio between the total density in the Oxyblot and the Ponceau.

Statistical Analysis

Descriptive data are shown as means \pm standard deviations. The data were not normally distributed, so the associations between plasma MDA levels and frailty were assessed using generalized linear regression models with a gamma-distributed dependent variable, including age and sex as possible confounders. The same procedure was used to test whether the association was preserved when including serum levels of cytosolic enzymes. Because the typical link function for the gamma model is the inverse, positive (negative) values for beta parameters imply an increase (decrease) of the denominator and decrease (increase) of the expected value for the model. Alternatively, the associations between plasma protein carbonylation levels and frailty were assessed using the beta regression model with a logit link function using age and sex as possible confounders. The significance of total serum protein levels was also tested when they were included in the model. All analyses were conducted using the Statistical Package R for Windows version 2.15.2 (<http://www.r-project.org>, Vienna, Austria). *P* was set at $<.05$.

RESULTS

Study Sample

Descriptive statistics for sex, prevalence of some major diseases, age, body mass index, waist–hip ratio, cognitive and functional ability scales, serum lipid profile, serum liver profile, plasma MDA, and plasma protein carbonylation levels are shown in Table 1. Frail people were only 5 years older than nonfrail persons. They obtained lower scores for cognitive and functional ability scales (PASE, Katz Index, Lawton Index), had a greater incidence of comorbidities (Charlson Index), and had higher serum alkaline phosphatase and serum total protein levels than nonfrail individuals ($P < .05$).

MDA Levels Increase with Frailty Status Independent of Sex or Age in Older Adults

Plasma lipid peroxidation was determined as MDA formed from lipid hydroperoxides, which is an established method of accurately measuring oxidative damage to lipids.¹⁵ As shown in Figure 1A, frail people had higher plasma hydroperoxide levels (measured as MDA) than nonfrail subjects ($P < .001$). Moreover, age- and sex-adjusted linear regression analysis showed a significant relationship between plasma MDA levels and frailty ($P < .001$) but not with sex or age (data not shown). After taking into consideration other possible confounders such as serum lipid profile (high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), total cholesterol, and

triglycerides), plasma MDA levels still depended on frailty status. The same happened when serum cytosolic enzymes, such as aspartate amino transferase, alanine amino transferase, gamma-glutamyl transferase, alkaline phosphatase, and lactate dehydrogenase were considered (data not shown).

A significant relationship was also observed between MDA levels and the level of available lipids (HDL-C, LDL-C, triglycerides) and between MDA and serum levels of cytosolic enzymes, which are usually considered to be markers of mild tissue damage.

Protein Oxidation Levels Increased with Frailty Independent of Sex or Age in Older Adults

Protein oxidation (usually determined as protein carbonylation) is a good measurement of systemic oxidative stress in humans.¹⁶ Thus, protein carbonylation was measured in plasma of individuals in the Toledo cohort. As with lipid peroxidation, frail people have higher levels of protein carbonylation than nonfrail subjects ($P < .001$) (Figure 1B). This protein carbonylation is related to frailty status ($P < .001$), but not to sex or age, even when serum total protein levels were included in the model (data not shown).

DISCUSSION

The current study shows that oxidative stress (determined as plasma protein or lipid oxidative damage) is related to frailty, irrespective of other possible confounders, including

Table 1. Descriptive Statistics According to Frailty Status

Variable	Nonfrail	Prefrail	Frail	Significance
Sex, n (%)				
Male	173 (42.2)	118 (42.4)	18 (33.3)	
Female	237 (57.8)	160 (57.5)	36 (66.7)	
Ischemic cardiomyopathy, n (%)	39 (9.5)	31 (11.1)	12 (22.2)	a,b
Cerebral vascular accident, n (%)	12 (2.9)	12 (4.3)	8 (14.8)	a,b
Diabetes mellitus, n (%)	80 (19.5)	63 (22.7)	19 (35.2)	a
Age, mean \pm SD	72.4 \pm 4.2	73.8 \pm 4.7	78.8 \pm 6.0	a
Body mass index, kg/m ² , mean \pm SD	29.7 \pm 5.0	29.5 \pm 4.9	30.0 \pm 5.5	
Waist–hip ratio, mean \pm SD	0.95 \pm 0.10	0.93 \pm 0.09	0.94 \pm 0.08	c
Physical Activity Scale for the Elderly score, mean \pm SD	93.1 \pm 44.0	63.7 \pm 41.7	22.7 \pm 23.2	a,b,c
Charlson Index, mean \pm SD	0.92 \pm 1.47	1.36 \pm 1.77	2.00 \pm 2.15	a,c
Katz Index of activities of daily living, mean \pm SD	5.99 \pm 0.12	5.93 \pm 0.40	4.87 \pm 1.65	a,b
Lawton Index of instrumental activities of daily living, mean \pm SD	6.96 \pm 1.37	6.13 \pm 1.97	3.60 \pm 2.36	a,b,c
Mini-Mental State Examination score, mean \pm SD	25.0 \pm 4.0	23.3 \pm 4.9	19.1 \pm 7.1	a,b,c
Geriatric Depression Scale score, mean \pm SD	1.67 \pm 2.04	3.28 \pm 3.48	5.79 \pm 3.33	a,b,c
High-density lipoprotein cholesterol, mg/dL, mean \pm SD	52.8 \pm 13.2	53.2 \pm 15.1	52.8 \pm 14.8	
Low-density lipoprotein cholesterol, mg/dL	120.6 \pm 33.1	118.0 \pm 34.4	118.5 \pm 35.3	
Total cholesterol, mg/dL	193.1 \pm 35.6	190.4 \pm 36.1	195.5 \pm 42.8	
Triglycerides, mg/dL	116.9 \pm 57.9	121.4 \pm 88.4	126.7 \pm 62.0	
Aspartate amino transferase, U/L cholesterol	20.5 \pm 10.4	20.0 \pm 9.3	19.5 \pm 13.2	
Alanine amino transferase, U/L cholesterol	20.5 \pm 12.7	19.9 \pm 9.0	20.0 \pm 12.8	
Gamma-glutamyl transferase, U/L cholesterol	25.7 \pm 22.1	28.7 \pm 26.5	30.3 \pm 26.9	
Alkaline phosphatase, U/L cholesterol	73.7 \pm 21.9	76.0 \pm 20.4	90.7 \pm 36.4	a,b
Lactate dehydrogenase, U/L cholesterol	375.1 \pm 70.3	378.3 \pm 90.0	370.6 \pm 68.5	
Albumin, g/dL cholesterol	7.32 \pm 0.43	7.28 \pm 0.45	7.17 \pm 0.43	
Total proteins, g/dL cholesterol	4.35 \pm 0.23	4.34 \pm 0.25	4.24 \pm 0.32	a

P-value is significant at the .05 level (^anonfrail vs frail; ^bprefrail vs frail; ^cnonfrail vs prefrail).
SD = standard deviation.

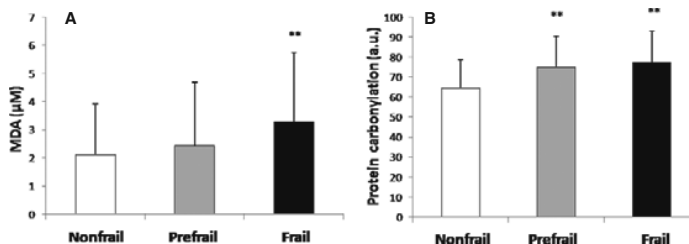


Figure 1. (A) Malondialdehyde (MDA) levels according to frailty status. (B) Protein carbonylation levels in nonfrail, prefrail, and frail individuals. $^*P < .01$ vs nonfrail, a.u. = arbitrary units.

age. Thus, frail persons display more oxidative damage than nonfrail subjects. The free radical theory of aging¹⁷ postulates that the progressive and irreversible accumulation of oxidative damage associated with aging contributes to impaired physiological function and increased incidence of disease. These are all associated with frailty.^{4,5} Thus, the involvement of oxidative stress in the development of frailty is biologically plausible. Mitochondria are major contributors to cellular metabolism, and it was previously showed that they constitute the main source of increased intracellular reactive oxygen species in aging.¹⁸ There is a decrease in resting metabolic rate with aging, but it was postulated in a previous study that, when chronic diseases occur in later life, resting metabolic rate increases because of the greater amount of energy needed to maintain cellular homeostasis.¹⁹ Because frailty is related to the presence of chronic diseases and functional decline, the greater amount of energy required to manage them could be why mitochondria produce excessive quantities of free radicals. This increase could also activate the nuclear factor kappa B pathway and lead to inflammation, which has also been linked to frailty.⁷ Furthermore, mitochondrial genetic variations contribute to frailty-related homeostatic deregulation and loss of muscle strength.²⁰ In this regard, some studies have suggested that oxidative stress may be related to age-associated frailty,^{8,9} but this was not established in controlled cohorts of a large number of persons. In addition, previous authors did not study plasma protein carbonylation as a marker of systemic oxidative damage in humans.¹⁶ High oxidative stress modifies the activity of proteins and makes them more susceptible to degradation.²¹ Thus, protein oxidation is a good measurement of systemic oxidative stress in humans.¹⁶ Protein carbonyl levels are associated with low grip strength²² and have recently been proposed as a biomarker of severe dependence.²³ An interlaboratory validation of lipid peroxidation measurement involving several groups showed that the HPLC method of measuring MDA-TBA adducts that was used in the current study is very specific and sensitive.²⁴ Other methods, especially the determination of TBA reactive substances, are not specific and are of little value for studying frailty.

The current results show that oxidative stress correlates with frailty but not with age; this therefore does not support the free radical theory of aging, at least in its strict formulation.¹⁷ A more-accurate version of the theory that has been termed “the cell signaling disruption theory of aging” has recently been formulated.²⁵

Females live longer than males in humans and in other species, such as rats. This is probably due to lower oxidative stress,²⁶ because of the effect of estrogens activating antioxidant enzymes.²⁷ After menopause, this effect may be lost. This may be why no sex differences were found in lipid or protein oxidative damage in persons aged 65 and older (more than a decade after menopause), despite having more women than men in this study.

Nevertheless, this study has some limitations. It was a cross-sectional study, and the effects of some other, unmeasured confounding variables cannot be overlooked. Blood was collected with EDTA, which did not allow other biomarkers of oxidative damage, such as 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and the ratio of glutathione disulfide to glutathione, to be analyzed.

The main finding reported here is that frailty is related to oxidative stress, whereas aging is not, at least in persons aged 65 and older. Thus, protein carbonylation and lipid hydroperoxides can be considered biomarkers, which can predict frailty.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Marilyn Noyes for her help in revising the English text.

Conflict of Interest: The authors have no financial or any other kind of personal conflicts with this paper.

This work was supported by Grants SAF2010-19498 from the Spanish Ministry of Education and Science; ISCIII2006-RED13-027 and ISCIII2012-RED-43-029 from the Red temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad; PROMETEO2010/074 from the Conselleria d'Educació, Cultura i Esport de la Generalitat Valenciana; and Intramural Grant RS2012-609 from Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia and European Union Fund CM1001 and FRAILOMIC-HEALTH.2012.2.1.1-2. This study was co-financed by FEDER funds from the European Union.

Author Contributions: Inglés: biochemical analysis, article drafting. Gambini: biochemical analysis, recruitment of the samples. Carnicero: statistical analysis, interpretation of data. García-García, Rodríguez-Mañas: study conception and design, recruitment of subjects. Olaso, Dromant: biochemical analysis. Borrás, Viña: direction of the project, writing the manuscript.

Sponsor's Role: The sponsor had no role in the design, methods, subject recruitment, data collections, analysis, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Mitnitski AB, Mogilner AJ, MacKnight C et al. The mortality rate as a function of accumulated deficits in a frailty index. *Mech Ageing Dev* 2002;123:1457–1460.
- Ahmed N, Mandel R, Fain MJ. Frailty: An emerging geriatric syndrome. *Am J Med* 2007;120:748–753.
- Xue QL. The frailty syndrome: Definition and natural history. *Clin Geriatr Med* 2011;27:1–15.
- Fried LP, Tangen CM, Walston J et al. Frailty in older adults: Evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;56A:M146–M156.
- Rockwood K, Mitnitski A. Frailty in relation to the accumulation of deficits. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007;62A:722–727.
- Abellan van Kan G, Rolland Y, Bergman H et al. The I.A.N.A Task Force on frailty assessment of older people in clinical practice. *J Nutr Health Aging* 2008;12:29–37.
- Hubbard RE, Woodhouse KW. Frailty, inflammation and the elderly. *Biogerontology* 2010;11:635–641.
- Wu JC, Shiesh SC, Kuo PH et al. High oxidative stress is correlated with frailty in elderly Chinese. *J Am Geriatr Soc* 2009;57:1666–1671.
- Serviddio G, Romano AD, Greco A et al. Frailty syndrome is associated with altered circulating redox balance and increased markers of oxidative stress. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009;22:819–827.
- Garcia-Garcia FJ, Gutierrez Avila G, Alfaro-Acha A et al. The prevalence of frailty syndrome in an older population from Spain. The Toledo Study for Healthy Aging. *J Nutr Health Aging* 2011;15:852–856.
- Orme JG, Reis J, Herz EJ. Factorial and discriminant validity of the Center for Epidemiological Studies Depression (CES-D) scale. *J Clin Psychol* 1986;42:28–33.
- Guralnik JM, Simonsick EM, Ferrucci L et al. A short physical performance battery assessing lower extremity function: Association with self-reported disability and prediction of mortality and nursing home admission. *J Gerontol* 1994;49:M85–M94.
- Schuit AJ, Schouten EG, Westertep KR et al. Validity of the Physical Activity Scale for the Elderly (PASE): According to energy expenditure assessed by the doubly labeled water method. *J Clin Epidemiol* 1997;50:541–546.
- Wong SH, Knight JA, Hopfer SM et al. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987;33:214–220.
- Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997;43:1209–1214.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329:23–38.
- Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;2:298–300.
- Sastre J, Pallardo FV, Pla R et al. Aging of the liver: Age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology* 1996;24:1199–1205.
- Ruggiero C, Ferrucci L. The endeavor of high maintenance homeostasis: Resting metabolic rate and the legacy of longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006;61A:466–471.
- Moore AZ, Biggs ML, Matteini A et al. Polymorphisms in the mitochondrial DNA control region and frailty in older adults. *PLoS One* 2010;5:e11069.
- Stadman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992;257:1220–1224.
- Howard C, Ferrucci L, Sun K et al. Oxidative protein damage is associated with poor grip strength among older women living in the community. *J Appl Physiol* (1985) 2007;103:17–20.
- de Gonzalo-Calvo D, de Luxan-Delgado B, Rodriguez-Gonzalez S et al. Oxidative protein damage is associated with severe functional dependence among the elderly population: A principal component analysis approach. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012;67A:663–670.
- Breusing N, Grune T, Andricic L et al. An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. *Free Radic Res* 2010;44:1203–1215.
- Vina J, Borras C, Abdelaziz KM et al. The free radical theory of aging revisited: The cell signaling disruption theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 2013;19:779–787.
- Vina J, Borras C, Gambini J et al. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett* 2005;579:2541–2545.
- Borras C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC et al. 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell* 2005;4:113–118.

