



## ORIGINAL

## Identificación de polimorfismos de un solo nucleótido relacionados con la fragilidad



Marta Inglés<sup>a,\*</sup>, Lucia Gimeno-Mallench<sup>b</sup>, Cristina Mas-Bargues<sup>b</sup>, Mar Dromant<sup>b</sup>, Raquel Cruz-Guerrero<sup>c</sup>, Francisco José García-García<sup>d</sup>, Leocadio Rodríguez-Mañas<sup>e</sup>, Juan Gambini<sup>b</sup>, Consuelo Borrás<sup>b</sup> y José Viña<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Freshage Research Group-Departamento de Fisioterapia, Universidad de Valencia, CIBERFES, INCLIVA, Valencia, España

<sup>b</sup> Freshage Research Group-Departamento de Fisiología, Universidad de Valencia, CIBERFES, INCLIVA, Valencia, España

<sup>c</sup> CIBERER-Grupo de Medicina Xenómica, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España

<sup>d</sup> División de Medicina Geriátrica, Hospital Virgen del Valle, Complejo Hospitalario de Toledo, Toledo, España

<sup>e</sup> Fundación para la Investigación Biomédica, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 10 de octubre de 2017

Aceptado el 27 de noviembre de 2017

On-line el 7 de abril de 2018

#### Palabras clave:

Fragilidad

Envejecimiento

Polimorfismos de un solo nucleótido

Variantes genéticas

### R E S U M E N

**Introducción:** La búsqueda de biomarcadores que permitan la detección y el posible tratamiento precoz de la fragilidad se ha convertido en uno de los objetivos primordiales de la comunidad científica geriátrica. El objetivo del presente estudio fue identificar polimorfismos de un solo nucleótido ([SNP] del inglés *single nucleotide polymorphisms*) relacionados con la fragilidad.

**Material y métodos:** El estudio se llevó a cabo en 152 sujetos de la cohorte del Estudio de Toledo (de 65 a 95 años de edad), clasificados como frágiles (n = 78), y no frágiles (n = 74), según los criterios de Fried. Tras la extracción de sangre se aisló y amplificó el ADN para el análisis de SNP mediante la tecnología *Axiom™ Genotyping* de Affymetrix. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa *Plink* y la biblioteca de R *library SNPassoc* para Windows.

**Resultados:** Los resultados del análisis mostraron 15 SNP con un valor de *p* inferior a 0,001. Destacamos aquellos implicados en procesos relacionados con la fragilidad, como el metabolismo energético, la regulación de procesos biológicos, la motilidad e integridad celular y la cognición.

**Conclusiones:** Los resultados sugieren que las variaciones genéticas identificadas en individuos frágiles y que están implicadas en procesos biológicos relacionados con la fragilidad podrían constituir biomarcadores que contribuyan a la detección precoz de la misma.

© 2018 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### Identification of single nucleotide polymorphisms related to frailty

#### A B S T R A C T

**Introduction:** The search for biomarkers that can lead to the early diagnosis and thus, early treatment of frailty, has become one of the main challenges facing the geriatric scientific community. The aim of the present study was to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) related to frailty.

**Material and methods:** The study was conducted on 152 subjects from the Toledo Study for Healthy Aging (65 to 95 years of age), and classified as frail (n=78), and non-frail (n=74), according to Fried's criteria. After blood collection, DNA was isolated and amplified for the analysis of SNPs using *Axiom™ Genotyping* technology (Affymetrix). Statistical analyses were performed using the *Plink* program and *library SNPassoc*.

#### Keywords:

Frailty

Ageing

Single nucleotide polymorphisms

Genetic variations

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [marta.ingles@uv.es](mailto:marta.ingles@uv.es) (M. Inglés).

**Results:** The results of the study showed 15 SNPs with a  $P < .001$ . Those SNPs involved in processes related to frailty, such as energy metabolism, regulation of biological processes, cell motility and integrity, and cognition are highlighted.

**Conclusions:** These results suggest that the genetic variations identified in frail individuals that are involved in biological processes related to frailty may be considered as biomarkers for the early detection of frailty.

© 2018 SEGG. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

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 longevidad. Sin embargo, la tendencia actual es a considerar más importante la prevención de la discapacidad (*healthspan*) que el simple aumento de la longevidad<sup>1</sup>.

En este contexto surge el concepto de fragilidad, un síndrome geriátrico caracterizado por una disminución de las reservas fisiológicas, así como de la función de múltiples sistemas, lo cual conlleva una mayor vulnerabilidad y baja capacidad para hacer frente a las agresiones externas<sup>2</sup>. Además, la fragilidad aumenta el riesgo de discapacidad, institucionalización e incluso de muerte<sup>2,3</sup>. De hecho, se ha descrito que la fragilidad puede predecir mejor la mortalidad que la propia edad cronológica<sup>4</sup>.

Los criterios de fragilidad más empleados son los definidos por Linda Fried: pérdida involuntaria de peso en el último año, sensación de agotamiento general referido por el propio paciente, lentitud de la marcha, bajo nivel de actividad física y disminución de la fuerza de agarre<sup>2</sup>.

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 se detecta y se trata 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 entre la comunidad científica dentro del campo de la geriatría. De hecho, se ha propuesto que la combinación de biomarcadores clínicos y biológicos de fragilidad podría afianzar su detección y diagnóstico precoz<sup>5</sup>. En este sentido, la fragilidad se ha vinculado con algunos biomarcadores relacionados con el sistema neuroendocrino, inmunológico, cardiovascular, musculoesquelético y metabólico<sup>6</sup>. Además, nuestro grupo ha publicado recientemente que la fragilidad se relaciona con biomarcadores relacionados con estrés oxidativo y deterioro cognitivo<sup>7,8</sup>.

Otro de los factores que podría estar relacionado con la fragilidad es la variación genética. La secuencia del ADN no es exactamente igual entre los individuos de una misma población, encontrándose cambios que afectan al fenotipo de los individuos por mutaciones, recombinaciones de genes, etc.<sup>9</sup>. Además, dentro de una misma población con una relativa homogeneidad genotípica podemos encontrar cambios sutiles de nucleótidos en la secuencia de ADN, tales como polimorfismos de un solo nucleótido ([SNP] del inglés *single nucleotide polymorphisms*) o variantes raras. Para que el cambio de nucleótido se considere como SNP, la frecuencia del alelo menos frecuente (en inglés *minor allele frequency*) debe ser 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 frecuencia del alelo menos frecuente sea menor del 1-5% hablamos de variantes raras<sup>10-12</sup>. Los SNP pueden localizarse bien en regiones codificantes del genoma, es decir, regiones exónicas (que pueden alterar la estructura de la proteína y, por tanto, su función), bien en regiones intrónicas no codificantes, las cuales pueden representar regiones reguladoras funcionalmente importantes. Dentro de estas regiones intrónicas se encuentran las UTR (del inglés *untranslated region*), de tal manera que los SNP localizados en ellas tampoco codifican proteínas<sup>13</sup>. A su vez, los SNP localizados en regiones exónicas codificantes pueden suponer o no un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína codificada, denominándose SNP no sinónimos o sinónimos, respectivamente.

La relevancia clínica de las variantes genéticas, sobre todo aquellas localizadas en regiones codificantes del genoma, radica no solo 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<sup>14</sup>.

Algunos autores han relacionado la presencia de SNP con la fragilidad. Así, se han descrito SNP relacionados con la regulación de la apoptosis, biosíntesis y regulación transcripcional<sup>15</sup>, con el metabolismo de la vitamina D<sup>16</sup> y en el ADN mitocondrial<sup>17</sup>. Sin embargo, estas relaciones no se han establecido claramente.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue identificar SNP relacionados con la fragilidad en una población concreta. Estos hallazgos tendrían un gran potencial para la aplicación clínica, proporcionando nuevos y más precisos marcadores genéticos que sirvan para el diagnóstico, pronóstico e incluso posibles nuevas dianas terapéuticas de la fragilidad.

## Material y métodos

### Pacientes

Se escogieron al azar 78 individuos frágiles y 74 no frágiles pertenecientes al Estudio de Toledo de Envejecimiento Saludable, una cohorte longitudinal de 2.488 sujetos mayores de 65 años y residentes en Toledo, España<sup>18</sup>. Todos los pacientes y sus familiares fueron plenamente informados de los objetivos y el alcance del estudio y firmaron un consentimiento informado a la entrada del mismo. Los criterios de inclusión fueron: edad igual o superior a 65 años y estar registrado en el último censo municipal de la provincia de Toledo, España. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Complejo Hospitalario de Toledo. Tras ser reclutados se realizó una evaluación estandarizada a todos los individuos que incluía varias entrevistas en casa realizadas por entrevistadores capacitados, generalmente enfermeras, así como diversos exámenes físicos. La primera evaluación se realizó en 2006-2009, y una segunda evaluación se realizó en 2013-2014.

### Criterios de fragilidad

La fragilidad se determinó mediante los criterios propuestos en el *Cardiovascular Health Study* por Linda Fried<sup>2</sup>. Así, un sujeto se consideró frágil si cumplía 3 o más de los siguientes 5 criterios: pérdida de peso, sensación de agotamiento general referido por el propio paciente, disminución de la fuerza de agarre, velocidad de marcha lenta y bajo nivel de actividad física. Los sujetos que no cumplían ningún criterio se consideraron no frágiles. La pérdida de peso se definió como una pérdida involuntaria de 4,5 kg o más durante el último año. El agotamiento fue evaluado mediante 2 preguntas de la Escala de Depresión del Centro de Estudios Epidemiológicos<sup>19</sup>: «sentía que cualquier cosa que hacía era un gran esfuerzo» y «sentía que no podía seguir haciendo cosas». La fuerza de agarre se midió con un dinamómetro hidráulico *Jaymar* y la velocidad de la marcha se determinó usando una prueba de 3 m marcha, ajustada por sexo y altura<sup>20</sup>. El bajo nivel de actividad física se definió como el peor quintil en la Escala de Actividad Física para Ancianos<sup>21</sup>.

### Obtención de la muestra

Las muestras de sangre total fueron extraídas en ayunas por personal autorizado en el hospital o en el propio domicilio del sujeto. Se emplearon tubos Vacutainer<sup>®</sup> con ácido etilendiaminotetraacético como anticoagulante. Una vez alicuotadas en tubos tipo Eppendorf, se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, uno de estos crioviales se envió al Centro Nacional de Genotipado-Instituto de Salud Carlos III (CeGen-ISCI) de Santiago de Compostela, para la extracción de ADN y genotipado de la muestra. Los entrevistadores, los examinadores físicos y el personal de laboratorio desconocía la condición de fragilidad de los sujetos.

### Genotipado de la muestra

El ADN fue extraído mediante el *Chemagic DNA blood kit*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras de ADN se genotiparon usando el *Axiom<sup>®</sup> Exome 319 Genotyping Array* de Thermo Fisher Scientific, que contiene aproximadamente 295.988 marcadores, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, 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 posteriormente 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 la versión del genoma GRCh37/hg19 y con el algoritmo *Axiom GT1*, disponible a través del programa *Genotyping Console 4.1.4* de Affymetrix.

Una vez obtenidas las imágenes de cada muestra en archivos se descartaron aquellas que no sobrepasaron los siguientes controles de calidad: filtro por *dishQC* (se eliminaron las muestras con valor inferior a 0,82) y filtro por *call rate* (se eliminaron las muestras con valor inferior a 97%).

### Análisis estadístico

Para la elección de los participantes se realizó un muestreo aleatorizado simple mediante el programa *IBM SPSS Statistics*, versión 21.0.

Previo al análisis estadístico los datos genéticos fueron sometidos a un procedimiento de control de calidad estándar de los estudios de asociación, en función de la desviación del equilibrio Hardy Weinberg y la tasa de genotipado. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa *Plink* y la biblioteca de *R library SNPpass* para Windows.

En el análisis individual de los SNP las diferencias en frecuencia de genotipos entre casos y controles para cada una de las variantes 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 o 2 en función del número de copias del alelo menos frecuente.

Para controlar las múltiples comparaciones realizadas (el mismo test estadístico repetido para cada uno de los SNP) se aplicó la corrección *False Discovery Rate*<sup>22</sup>, de tal manera que una probabilidad ajustada por FDR (valor  $q$ )  $\leq 0,05$  se consideró significativa.

### Resultados

Los estadísticos descriptivos, así como la comparación entre grupos de las principales variables antropométricas y sociodemográficas se muestran en la *tabla 1*. Tal y como se puede observar, los grupos fueron homogéneos en cuanto a edad, sexo e índice de masa corporal ( $p > 0,05$ ). En cuanto al número de criterios de fragilidad cumplidos los no frágiles no cumplieron ningún criterio, y la media de criterios cumplidos por parte de los frágiles fue de  $3,4 \pm 0,6$ .

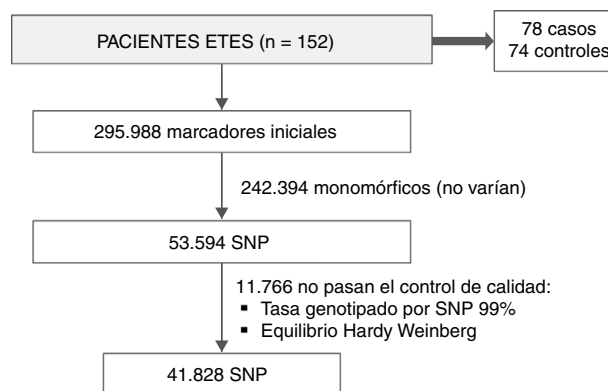
En cuanto al estudio de SNP de los 295.988 marcadores (SNP y variantes raras) analizados, eliminando monomórficos, es decir, aquellos que presentaron el mismo genotipo en toda la población de estudio (una gran mayoría en población española) y tras los filtros aplicados, quedaron un total de 41.828 SNP apropiados para este estudio (*fig. 1*).

Los resultados mostraron 105 SNP con un valor de  $p < 0,005$ . De ellos, destacamos los 15 que presentaban un valor de  $p < 0,001$ ; aunque no se consideraron estadísticamente significativos tras aplicar la corrección FDR, lo cual es frecuente en los estudios de asociación, sí podemos hablar de «SNP relacionados con la fragilidad». En la *tabla 2* se muestran dichos polimorfismos usando el sistema de nomenclatura «rs» (número de identificación de referencia del SNP),

**Tabla 1**  
Comparación de datos antropométricos y demográficos entre grupos

	No frágiles (n = 74)	Frágiles (n = 78)	p
Edad (años)	76,4 $\pm$ 5,7	77,9 $\pm$ 5,8	0,094
Sexo (hombres/ mujeres)	23/51	25/53	0,898
IMC (kg/ m <sup>2</sup> )	29,2 $\pm$ 5,8	29,4 $\pm$ 4,8	0,708
Crit. frag. (n.º)	0	3,4 $\pm$ 0,6	0,001*

Los datos se expresan como media ( $\pm$ desviación estándar).  
Crit. frag.=número de criterios de fragilidad cumplidos; IMC: índice de masa corporal.  
\*  $p < 0,01$  significación estadística.



**Figura 1.** Esquema de los SNP obtenidos tras los controles de calidad pertinentes. ETES: Estudio de Toledo de Envejecimiento Saludable; SNP: polimorfismo de un solo nucleótido).

**Tabla 2**  
Polimorfismos con *p* valor menor a 0,001

SNP	Crom.	Localización	Función del gen asociado	Odds ratio	<i>p</i>
rs11812479	10	Desconocida	Desconocida	3,149	0,000038
rs10457204	6	Intrón	Metabolismo energético/autofagia	3,345	0,000049
rs737154	5	Exón sinónimo GTG ⇒ GTA V [Val] ⇒ V [Val]	Transporte de moléculas	2,618	0,000222
rs16889283	8	Exón no sinónimo GGC ⇒ AGCG [Gly] ⇒ S [Ser]	Desconocida (posible función gonadal masculina)	2,832	0,000251
rs3773603	3	Exón sinónimo GGA ⇒ GGG G [Gly] ⇒ G [Gly]	Regulación de procesos biológicos/sistema musculoesquelético	0,233	0,000292
rs3809430	14	Exón sinónimo CCG ⇒ CCA P [Pro] ⇒ P [Pro]	Función gonadal masculina	2,76	0,000386
rs7096031	10	Desconocida	Regulación de procesos biológicos	2,923	0,000409
rs4148883	4	Intrón	Metabolismo energético	0,409	0,000429
rs11208257	1	Exón no sinónimo TAT ⇒ CATY [Tyr] ⇒ H [His]	Metabolismo energético	3,359	0,000607
rs613444	9	Desconocida	Desarrollo pulmonar y del cerebro	0,394	0,000702
rs1929860	1	Exón no sinónimo GTA ⇒ ATA V [Val] ⇒ I [Ile]	Motilidad e integridad celular	2,514	0,000764
rs11006229	10	UTR-5	Cognición/proliferación celular/apoptosis	0,329	0,000780
rs1126671	4	Exón no sinónimo ATT ⇒ GTT I [Ile] ⇒ V [Val]	Metabolismo energético	2,412	0,000832
rs1126673	4	Exón no sinónimo GTC ⇒ ATC V [Val] ⇒ I [Ile]	Metabolismo energético	2,412	0,000832
rs1387144	11	Intrón	Cognición	2,704	0,000879

Polimorfismos con valor de *p* < 0,001, ordenados en función del valor de *p*. La significación se establece en 0,05/41828 = 0,0000012.

Crom: cromosoma; UTR: *untranslated region*.

el cromosoma donde se localizan y la *odds ratio* (OR) del alelo raro (menos frecuente) del SNP usando el alelo común (más frecuente) de dicho SNP como referencia. Cuando dicha OR es superior a 1 determina una mayor prevalencia del alelo menos frecuente del SNP en individuos frágiles, y por tanto dicho alelo se considera «de riesgo». A partir de ahora, para su mejor entendimiento, lo llamaremos «SNP de riesgo». De forma contraria, cuando la OR es inferior a 1 determina una menor prevalencia del alelo menos frecuente del SNP en individuos frágiles y, por tanto, se considera «protector». A partir de ahora lo llamaremos «SNP protector». De este modo, los resultados muestran que 11 de los SNP localizados podrían ser considerados «de riesgo» y 4 de ellos «protectores». Por otro lado, podemos observar que los 15 SNP obtenidos se localizan en diferentes regiones del genoma: 8 en zonas exónicas (siendo 3 de ellos sinónimos y 5 no sinónimos), 3 en zonas intrónicas, uno en una región UTR y 3 de ellos se desconoce. Entre ellos, destacamos los SNP localizados en genes que participan en procesos relacionados con la fragilidad:

Metabolismo energético: encontramos 4 SNP de riesgo: 1 (rs10457204) en el gen *FIG4* (*Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate 5-phosphatase*), 2 (rs1126671 y rs1126673) en el gen *ADH4* (*Alcohol Dehydrogenase 4 [class II], pi polypeptide*) y uno (rs11208257) en el gen *PGM1* (*Phosphoglucomutase 1*). También encontramos un SNP protector (rs4148883) en el gen *ADH4*.

Regulación de procesos biológicos: encontramos un SNP protector (rs3773603) en el gen *CACNA2D3* (*Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3*) y uno de riesgo (rs7096031) en el gen *OTUD1* (*OTU deubiquitinase 1*).

Función estructural o relación con sistema musculoesquelético: encontramos 4 SNP de riesgo (rs1929860, rs10457204, rs737154, rs11208257) en los genes *CDC42BPA* (*CDC42 binding protein kinase alpha [DMPK-like]*), *FIG4*, *SLC12A7* (*Solute Carrier Family 12 [Potassium/Chloride Transporters], Member 7*) y en *PGM1* (*Phosphoglucomutase 1*) y un SNP protector (rs3773603) en *CACNA2D3*.

Cognición: destaca un SNP de riesgo (rs1387144) presente en el gen *BDNF-AS* (*BDNF antisense RNA [non-protein coding]*). También hemos encontrado un SNP protector (rs11006229) en el gen *SGMS1* (*Sphingomyelin synthase 1*).

## Discusión

En el presente estudio, mediante técnicas de genotipado masivo, hemos identificado 15 SNP relacionados con la fragilidad, en pacientes reclutados en el Estudio de Toledo de Envejecimiento Saludable.

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<sup>23</sup>. Se ha observado que este componente genético desempeña 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 las mujeres depende más de factores ambientales<sup>24</sup>. Además, se ha podido observar cómo la influencia del componente genético es mayor en edades avanzadas<sup>24</sup>.

El SNP más significativo en nuestro estudio (considerado de riesgo, por presentar una OR mayor que 1), se encuentra en el gen *FIG4*, que codifica a una fosfatasa que reduce los niveles de PI(3,5)P2 (fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato), lo cual se ha relacionado con dificultades para completar el proceso de autofagia<sup>25</sup>. Por otro lado, también se ha propuesto que *FIG4* codifica a una fosfatasa sensible a la insulina, de tal manera que la disminución de sus niveles produce una mejora en la resistencia a la insulina<sup>26</sup>. 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<sup>27</sup>, la esclerosis lateral amiotrófica<sup>28</sup> y el síndrome de Yunis Varon<sup>29</sup>. Todos ellos, tal y como sucede con el síndrome de fragilidad, son procesos caracterizados por un deterioro funcional progresivo, lo cual podría indicar una base común subyacente.

Otro de los SNP relacionado con la fragilidad (en este caso protector, por presentar una OR menor de 1) lo encontramos en el gen *CACNA2D3*, el cual codifica un canal de calcio dependiente de voltaje. 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 contracción muscular, la proliferación, la motilidad, la angiogénesis, la resistencia a la apoptosis y la regulación transcripcional. Todos estos procesos podrían estar alterados en la fragilidad.

Además, algunos de los genes en los cuales hemos encontrado SNP se han relacionado con procesos tumorales, los cuales a su vez están relacionados con la vía de la apoptosis, coincidiendo con Ho et al.<sup>15</sup>. De esta manera, el gen que acabamos de mencionar, el *CACNA2D3*, se ha propuesto como un supresor tumoral<sup>30,31</sup>. En cuanto al gen *ADH4* sus niveles también se han relacionado con un mejor pronóstico ante determinados tipos de cáncer<sup>32</sup>. El gen *NFIB* (*Nuclear factor I/B*) se ha propuesto como un oncogén sobreexpresado en algunos cánceres como el de pulmón, favoreciendo la proliferación y la viabilidad celular<sup>33</sup>. En cuanto al gen *SGMS1*



un aumento en la actividad de la proteína que codifica, la esfingomielina sintasa, se ha relacionado con procesos en los que existe aumento de la proliferación celular, por tanto, también podría ser considerado como un oncogén<sup>34</sup>. La presencia de estos SNP en los individuos frágiles podría condicionar la evolución del proceso tumoral o la respuesta a los tratamientos aplicados.

Es interesante destacar la presencia de SNP en genes que se han relacionado con la motilidad celular y el sistema musculoesquelético, tales como CDC42BPA, el cual presenta un SNP de riesgo. Este gen codifica una quinasa que actúa por debajo de CDC42 en los procesos de reorganización del citoesqueleto de actina (sobre todo en la formación de actina periférica), necesaria para la integridad y migración celular<sup>35</sup>. Otros genes que se han relacionado con el sistema musculoesquelético y que se expresan en el músculo son FIG4, SLC12A7, CACNA2D3 o PGM 1.

Además, también encontramos SNP 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, que codifica a un transcrito antisentido que emplea diversos mecanismos transcripcionales y postranscripcionales 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 7 veces la expresión de BDNF, aumenta los niveles de proteína e induce crecimiento y diferenciación neuronal, tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>36</sup>. Por tanto, la presencia de un SNP protector en este gen podría ser responsable de los mayores niveles de BDNF en plasma encontrados en individuos no frágiles<sup>8</sup>. Por otro lado, la proteína codificada por el gen SGMS1 (que presenta un SNP protector), sintetiza la esfingomielina, que forma parte de la vaina de mielina que rodea a los axones. Esta síntesis se produce a través de la transferencia del grupo fosfolina de la fosfatidilcolina al grupo hidroxilo primario de la ceramida. La reacción es bidireccional en función de los respectivos niveles de los esfingolípidos y la ceramida. De esta manera se consume ceramida (regulador negativo de la proliferación celular) y fosfatidilcolina, y se forma esfingomielina y diacilglicerol (factor mitogénico), lo cual se ha relacionado con su efecto proliferativo celular<sup>37</sup>. Además, suprime la apoptosis mediada por BAX (proteína perteneciente a la subfamilia proapoptótica de BCL-2) y la muerte celular en respuesta a estímulos tales como el peróxido de hidrógeno<sup>38</sup>.

Este estudio tiene algunas limitaciones: la muestra es pequeña y limitada a la provincia de Toledo (España), por lo que se necesitan futuros estudios que determinen la presencia de estas variaciones en otras poblaciones. Además, tras aplicar la corrección FDR no se alcanza el nivel de significación estadística (frecuente en los estudios de asociación), lo cual reitera la necesidad de ampliar el tamaño muestral del estudio.

Por tanto, los resultados de este estudio sugieren que existen variaciones genéticas relacionadas con la fragilidad y que dichas variaciones están implicadas en procesos biológicos relacionados con la misma. De confirmarse, nuestros resultados podrían contribuir a la identificación de posibles biomarcadores genéticos de fragilidad, lo cual podría ayudar a la detección precoz de la misma.

## Financiación

Este trabajo fue apoyado por becas SAF2013-44663-R y SAF2016-75508-R del Ministerio español de Educación y Ciencia (MEC); PROMETEO2014/ 056 de la Conselleria d'Educació, Cultura i Esport de la Generalitat Valenciana; RS2012-609 y financiados por la UE CM1001, FRAILOMICHEALTH. 2012.2.1.1-2, CIBERFES-ISCIII y ADVANTAGE-724099 Join Action (HP-JA) 3rd EU Health Programme. El estudio ha sido cofinanciado por los Fondos de la Unión Europea.

## Autoría

Concepción y diseño del estudio: J Viña, C. Borrás y J Gambini. Reclutamiento de sujetos: F.J. García-García, L. Rodríguez-Mañas.

Procedimientos experimentales: M. Inglés, L. Gimeno-Mallench, C. Mas-Bargues, M. Dromant.

Análisis genómico e interpretación de los datos estadísticos: R. Cruz-Guerrero.

Redacción del manuscrito: M. Inglés, C. Borrás y J. Viña.

Todos los autores participaron en la revisión crítica del manuscrito y todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final. Asimismo, todos los autores tuvieron pleno acceso a los datos del estudio y tuvieron la responsabilidad final de la decisión de enviarlo para su publicación.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Mussol J. Resultados de la aplicación en atención primaria de un protocolo de valoración geriátrica integral en ancianos de riesgo. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2002;37:249–53.
- Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Frailty in older adults: Evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001;56:M146–56.
- Rockwood K, Mitnitski A. Frailty in relation to the accumulation of deficits. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007;62:722–7.
- Mitnitski AB, Graham JE, Mogilner AJ, Rockwood K. Frailty, fitness and late-life mortality in relation to chronological and biological age. *BMC Geriatr.* 2002;2:1.
- Rodríguez-Manas L, Fried LP. Frailty in the clinical scenario. *Lancet.* 2015;385:e7–9.
- Vina J, Tarazona-Santabalbina FJ, Perez-Ros P, Martínez-Arnau FM, Borrás C, Olaso-González G, et al. Biology of frailty: Modulation of ageing genes and its importance to prevent age-associated loss of function. *Mol Aspects Med.* 2016;50:88–108.
- Inglés M, Gambini J, Carnicero JA, García-García FJ, Rodríguez-Manas L, Olaso-González G, et al. 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.* 2014;62:1324–8.
- Inglés M, Gambini J, Mas-Bargues C, García-García FJ, Vina J, Borrás C. Brain-derived neurotrophic factor as a marker of cognitive frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017;72:450–1.
- Jorde LB, Wooding SP. Genetic variation, classification and 'race'. *Nat Genet.* 2004;36 11 Suppl:S28–33.
- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999;234:177–86.
- Gibson G. Rare and common variants: Twenty arguments. *Nat Rev Genet.* 2011;13:135–45.
- Bustamante CD, Burchard EG, de la Vega FM. Genomics for the world. *Nature.* 2011;475:163–5.
- Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12:683–91.
- MacAuley A, Ladiges WC. Approaches to determine clinical significance of genetic variants. *Mutat Res.* 2005;573:205–20.
- Ho YY, Matteini AM, Beamer B, Fried L, Xue QL, Arking DE, et al. Exploring biologically relevant pathways in frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011;66:975–9.
- Matteini AM, Walston JD, Bandeen-Roche K, Arking DE, Allen RH, Fried LP, et al. Transcobalamin-II variants, decreased vitamin B12 availability and increased risk of frailty. *J Nutr Health Aging.* 2010;14:73–7.
- Moore AZ, Biggs ML, Matteini A, O'Connor A, McGuire S, Beamer BA, et al. Polymorphisms in the mitochondrial DNA control region and frailty in older adults. *PLoS One.* 2010;5:e11069.
- García-García FJ, Gutierrez Avila G, Alfaro-Acha A, Amor Andres MS, de los Ángeles de la Torre Lanza M, Escribano Aparicio MV, et al. The prevalence of frailty syndrome in an older population from Spain The Toledo Study for Healthy Aging. *J Nutr Health Aging.* 2011;15:852–6.
- 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, Glynn RJ, Berkman LF, Blazer DG, 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:M85–94.
- Schuit AJ, Schouten EG, Westendorp KR, Saris WH. 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;50:541–6.

22. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol.* 1995;57:289–300.
23. Clegg A, Young J, Iliffe S, Rikkert MO, Rockwood K. Frailty in elderly people. *Lancet.* 2013;381:752–62.
24. Dato S, Montesanto A, Lagani V, Jeune B, Christensen K, Passarino G. 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).* 2012;34:571–82.
25. Wood CS, Schmitz KR, Bessman NJ, Setty TG, Ferguson KM, Burd CG. PtdIns4P recognition by Vps74/GOLPH3 links PtdIns 4-kinase signaling to retrograde Golgi trafficking. *J Cell Biol.* 2009;187:967–75.
26. Ikononov OC, Sbrissa D, Ijuin T, Takenawa T, Shisheva A. Sac3 is an insulin-regulated phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate phosphatase: Gain in insulin responsiveness through Sac3 down-regulation in adipocytes. *J Biol Chem.* 2009;284:23961–71.
27. Lenk GM, Ferguson CJ, Chow CY, Jin N, Jones JM, Grant AE, et al. Pathogenic mechanism of the FIG4 mutation responsible for Charcot-Marie-Tooth disease CMT4J. *PLoS Genet.* 2011;7:e1002104.
28. Chow CY, Landers JE, Bergren SK, Sapp PC, Grant AE, Jones JM, et al. Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am J Hum Genet.* 2009;84:85–8.
29. Campeau PM, Lenk GM, Lu JT, Bae Y, Burrage L, Turnpenny P, et al. Yunis-Varon syndrome is caused by mutations in FIG4, encoding a phosphoinositide phosphatase. *Am J Hum Genet.* 2013;92:781–91.
30. Palmieri C, Rudraraju B, Monteverde M, Lattanzio L, Gojis O, Brizio R, et al. Methylation of the calcium channel regulatory subunit alpha2delta-3 (CACNA2D3) predicts site-specific relapse in oestrogen receptor-positive primary breast carcinomas. *Br J Cancer.* 2012;107:375–81.
31. Hanke S, Bugert P, Chudek J, Kovacs G. 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.* 2001;264:69–75.
32. Wei RR, Zhang MY, Rao HL, Pu HY, Zhang HZ, Wang HY. Identification of ADH4 as a novel and potential prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* 2012;29:2737–43.
33. Dooley AL, Winslow MM, Chiang DY, Banerji S, Stransky N, Dayton TL, et al. Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer. *Genes Dev.* 2011;25:1470–5.
34. Burns TA, Subathra M, Signorelli P, Choi Y, Yang X, Wang Y, et al. Sphingomyelin synthase 1 activity is regulated by the BCR-ABL oncogene. *J Lipid Res.* 2013;54:794–805.
35. Wilkinson S, Paterson HF, Marshall CJ. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol.* 2005;7:255–61.
36. Modarresi F, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, Fatemi RP, Magistri M, Brothers SP, et al. Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nat Biotechnol.* 2012;30:453–9.
37. Huitema KJ, van den Dikkenberg JF, Brouwers JC, Holthuis Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* 2004;23:33–44.
38. Tafesse FG, Huitema K, Hermansson M, van der Poel S, van den Dikkenberg J, Uphoff A, et al. Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. *J Biol Chem.* 2007;282:17537–47.