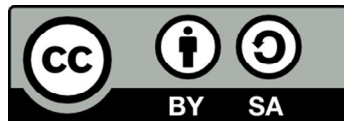




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio de envejecimiento de Mataró: Factores hormonales y genéticos que influyen en el envejecimiento

Mireia Mora Porta



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement- Compartitqual 3.0. Espanya de Creative Commons](#).

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento - Compartitqual 3.0. España de Creative Commons](#).

This doctoral thesis is licensed under the [Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License](#).



TESIS DOCTORAL:
ESTUDIO DE ENVEJECIMIENTO DE MATARÓ:
FACTORES HORMONALES Y GENÉTICOS QUE INFLUYEN
EN EL ENVEJECIMIENTO

Doctorando:

Mireia Mora Porta

Director de la tesis: Dr. Manel Puig-Domingo

Tutora de la tesis: Dra. Irene Halperin Rabinovich

PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Año 2015

A mis abuelos y a mis padres

AGRADECIMIENTOS:

Apenas he empezado a escribir y ya empiezan a saltar las primeras lágrimas. Lágrimas que recogen muchas emociones de los últimos años, los años que he dedicado a este proyecto y a mi trabajo en general, emociones de los que han compartido este tiempo conmigo, tanto a nivel profesional como personal.

Corresponde empezar los agradecimientos de esta tesis dando las gracias a todos los participantes del Estudio de Envejecimiento de Mataró, ancianos que sin recibir nada a cambio, prestaron su tiempo a este proyecto. Sin ellos, sin duda, este proyecto y los precedentes no se habrían llevado a cabo. Esto me lleva en segundo lugar a dar las gracias a todos los miembros del grupo del Estudio de Envejecimiento de Mataró, quienes idearon este estudio y dedicaron mucho esfuerzo y tiempo a que se ejecutara.

Gracias Manel, por ser mi mentor en la endocrinología, por haber siempre creído y confiado en mí, por tu constante apoyo en el ámbito profesional y también en el personal, por haberme invitado a participar en este proyecto y hacer que fuera un poquito mío. Por tu paciencia, por tus enseñanzas y tu apoyo, por saber felicitar me cuando acertaba, y guiarme con cariño cuando me equivocaba. Gracias Mateu y Elisabet, por tenderme los brazos para participar en este proyecto y por ayudarme en todo momento. Gracias Javier, por tu tiempo y paciencia... por los cientos de correos intercambiados y las múltiples versiones de tablas a corregir.

Gracias Irene, por ser mi tutora en este trabajo, pero sobre todo, por ser mi inspiración en la endocrinología. Te debo, en gran parte, la buena elección de esta especialidad. Gracias por haberme acogido y ayudado en todo momento, por transmitirme tus conocimientos y siempre estar dispuesta a ayudarme. Gracias Enric, por tu apoyo y cariño. Gracias Pep, por confiar en mí y apoyarme en mis proyectos.

Gracias Amanda, compañera de batallas desde el primer día. Son muchas cosas las que hemos compartido juntas, mañanas de dispensarios, tardes de despacho, noches de guardia... y alguna que otra fiesta y viaje. Gracias por todo tu apoyo y paciencia, tanto a nivel profesional como personal. Gracias Felicia, por ser buena compañera y sobre todo amiga, por tu comprensión, tu ayuda y tu paciencia. Gracias Vero y Gloria, mis niñas, no sé si yo os ayudé en algo como correspondía como R mayor, pero sin duda vosotras me habéis ayudado a mí. Gracias a todos los compañeros del servicio que han contribuido a mi formación, adjuntos, R mayores y pequeños, co-Rs de otras especialidades, enfermeras y administrativas, por sus enseñanzas, cambios de guardias, ayudas técnicas, etc... Han hecho que mi paso por el hospital, la especialidad, y el desarrollo de esta tesis, hayan sido un poco más fáciles.

Gracias a mis amigos, aquellos que aunque muchos de ellos no tengan nada que ver con la medicina, han sabido apoyarme en todo momento a pesar de que a menudo no entendían mi trabajo.

Gracias a mi hermana Meritxell, y a Carlos. Por ser siempre comprensivos conmigo, por ser una buena amiga y una gran hermana. Por cuidarme y protegerme como corresponde a una hermana mayor.

Gracias a Marc, por tu amor, tu apoyo y por tu cariño; por tu comprensión y tu interés en el proyecto, por ser capaz de mover cielo y tierra por darme una mano, por estar ahí.

Gracias a mis padres, Jeroni y Gloria. Soy tremendamente afortunada de tenerles como padres. Gracias por su amor, constante cariño y ayuda a lo largo de toda mi vida. Ayuda, evidentemente en el ámbito personal, pero también en el ámbito profesional, haciendo que todo fuera más fácil. Gracias por sus constantes sacrificios por hacer de mí lo que soy.

Quiero terminar los agradecimientos de esta tesis dando las gracias a mis abuelos, la “mami Lola”, el “avi Antonio” y “els iaio Ramon i Maria”. Especialmente a ellos está dedicada esta tesis. Tuve la suerte de crecer rodeada de ellos en el día a día, criándome, mimándome, cuidándome, educándome y ayudándome.

ABREVIATURAS:

Abreviaturas (por orden alfabético):

Aa: aminoácidos

A β 0: péptido A β

ACTH: adrenocorticotropina

ADN: ácido desoxirribonucleico

AgRP: agouti related peptide

AMPK: AMP activated protein kinasa

ApoE: apolipoproteína E

APP: proteína precursora amiloide

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP III: Adult Panel Treatment III

BHE: barrera hematoencefálica

CART: cocaine and amphetamine regulated transcript

CBG: cortisol-binding globulin (globulina transportadora del cortisol)

CCK: colecistokinina

CPT1: carnitina palmitoil-transferasa 1

CRH: corticotropin releasing hormone (hormona liberadora de la corticotropina)

CV: cardiovascular

DHEA: dehidroepiandrosterona

DHEAs: dehidroepiandrosterona sulfato

DM2: diabetes mellitus 2

DMO: densidad mineral ósea

EA: enfermedad de Alzheimer

ECV: enfermedad cardiovascular

FGF23: fibroblast growth factor 23 (factor de crecimiento de fibroblasto 23)

FSH: hormona folículoestimulante

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GC: glucocorticoides

GH: growth hormone (hormona de crecimiento)

GHRH: growth hormone releasing hormone (hormona liberadora de la GH)

GHS-R1: growth hormone secretagogue receptor 1 (receptor de secretagogos de la GH 1)

GIM: grosor de la íntima media

GLP-1: glucagon like peptide -1

GOAT: ghrelin-O-acil transferasa

HDL: high-density lipoprotein

HHA: hipotálamo-hipófisis-adrenal

IDF: International Diabetes Federation

IGF-I: insulin-growth factor –I

IGF-BPs: insulin Growth Factor Binding Proteins

IL-6: interleukina-6

IMC: índice de masa corporal

LH: hormona luteinizante

LDL: low-density lipoprotein

LPL: lipoprotein lipasa

MC3R y MC4R: receptores de melanocortina 3 y 4

MEC: MiniExamen Cognoscitivo

MMSE: MiniMental State Examination

MNA-SF: MiniNutritional Assessment- Short Form

α MSH: péptido productor de POMC

NPY: neuropéptido Y

OR: odds ratio

Pb: pares de bases

PET: positron emission tomography

POMC: proopiomelanocortina

PRL: prolactina

PP: polipéptido pancreático

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PYY: péptido YY

RNM: resonancia magnética nuclear

ROS: reactive oxygen species

SCD1: esteroil-CoA desaturasa 1

DE: desviación estándar

SHBG: sex hormone binding globulin (globulina fijadora de las hormonas sexuales)

sir-2: silent information regulator-2

SM: síndrome metabólico

SNP: single nucleotide polymorphism

T3: triiodotironina

T4: tiroxina

THS: tratamiento hormonal sustitutivo

TSH: thyrotropin stimulating hormone (hormona estimuladora de la tiroides o tirotrópina)

TNF α : tumor necrosis factor α (factor de necrosis tumoral α)

UCP 2: uncoupling protein 2

VAS: visual analog scale (escala analógica visual)

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule -1

ÍNDICE:

I. INTRODUCCIÓN	3
1.Envejecimiento: conceptos y procesos fisiopatológicos.	5
1.1.El síndrome metabólico en la senectud.....	7
1.2.Sarcopenia y envejecimiento.....	9
1.3.Anorexia del envejecimiento	11
1.4.El cerebro en el envejecimiento	16
2.Genética y epigenética del envejecimiento.....	20
3.Endocrinología del envejecimiento	24
4.Somatopausia: afectación del eje somatotropo	29
5.Ghrelina	32
5.1.Papel de la ghrelina en el Síndrome Metabólico	36
5.2.Papel de la ghrelina en la cognición.....	42
5.3.Polimorfismos de la ghrelina y sus implicaciones	45
6.Obestatina	51
6.1.Papel de la obestatina en el Síndrome Metabólico	53
6.2.Papel de la obestatina en la cognición.....	54
6.3.Papel de la obestatina en la capacidad funcional.....	55
7.Adrenopausia: afectación del eje adrenal	57
7.1.Polimorfismos del gen del receptor de glucocorticoides.....	63
8.Menopausia y andropausia: afectación del eje gonadal	66
8.1.Menopausia	66
8.2.Andropausia.....	69
9.Factores que influyen en la supervivencia.....	71
10.Estudios de envejecimiento en la literatura	74
11.Estudio de Envejecimiento de Mataró	76
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	83
III. OBJETIVOS	87
IV. RESULTADOS.....	91
Original 1:	97
Original 2:	109
Original 3:	119
Original 4:	151

Original 5:	163
Original 6:	175
Original 7:	187
V. DISCUSIÓN.....	199
1.Papel de los ejes somatotropo, gonadal y adrenal en la capacidad funcional y el desarrollo de fragilidad en nuestra población de estudio.....	201
2.Frecuencia del polimorfismo ER22/23EK del gen del receptor de GC y asociación del mismo con la fuerza muscular, capacidad funcional, estado mental y nutricional, y la presencia de los distintos componentes del SM.....	205
3.Frecuencia de la variante alélica 192 pb del promotor del gen de IGF-I y su asociación con la fuerza muscular, capacidad funcional, estado mental y nutricional, y la presencia de los distintos componentes del SM.	207
4.Frecuencia de los polimorfismos del gen de la ghrelina y su asociación con el estado mental y la presencia de los distintos componentes del SM.....	211
5.Papel de la obestatina en el estado nutricional, hambre, riesgo de SM y deterioro funcional en la muestra poblacional del estudio de envejecimiento de Mataró.	218
6.Asociación entre los marcadores metabólicos y hormonales y la supervivencia.	225
7.Dificultades y limitaciones del estudio.....	229
VI. CONCLUSIONES	231
VII. BIBLIOGRAFÍA	237

I. INTRODUCCIÓN

1. ENVEJECIMIENTO: CONCEPTOS Y PROCESOS FISIOPATOLÓGICOS.

El envejecimiento es un proceso fisiológico heterogéneo que se caracteriza por el deterioro de la capacidad funcional, la disminución del potencial de respuesta a demandas adaptativas y del control basal de la homeostasis, y una mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades y discapacidades (Barbieri et al 2008). Las tasas de envejecimiento de la población mundial están aumentando de forma rápida, sobre todo en los países desarrollados, con incrementos de población de más de 65 años que van desde los 461 millones de personas en 2004 a una estimación de 2 mil millones en 2050 (Kinsella 2005;Clegg et al 2013). Este hecho tiene profundas implicaciones para la planificación y prestación de la atención sanitaria y social. Actualmente se espera que la longevidad se incremente más que nunca, con un aumento en la esperanza de vida de 79 años en los países desarrollados, en comparación a 1900 que era de 47 años (Atalayer & Astbury 2013). Este aumento de la esperanza de vida se explica por la mayor capacidad económica de las sociedades desarrolladas y las mejoras de la atención sanitaria que ello conlleva, que han propiciado una caída en las tasas de mortalidad. Dicho aumento de la esperanza de vida ha ocasionado un cambio en la composición demográfica de la población, con un número de personas mayores de 65 años que aumentará en un 135% entre 2010 y 2050 (Atalayer & Astbury 2013). Sin embargo, estos años adicionales de supervivencia no necesariamente se acompañan de una buena condición de salud ni están libres de discapacidad.

El envejecimiento es el resultado de una acumulación de daños moleculares y celulares a lo largo de la vida, causados por múltiples factores y regulados por una red compleja de mecanismos de mantenimiento y reparación (Kirkwood 2005). La magnitud exacta de daño celular necesaria para alterar la funcionalidad de un órgano se desconoce, sin embargo, algunos sistemas tienen mecanismos redundantes que confieren una reserva fisiológica necesaria para compensar el declive asociado a la edad y las enfermedades; por ejemplo, el cerebro y el músculo esquelético tienen más neuronas y miocitos, respectivamente, que los necesarios para su supervivencia. A lo largo de la vida adulta, las funciones fisiológicas van declinando de forma gradual, con una menor capacidad de síntesis celular de proteínas, una disminución de la función inmune, un aumento de la masa grasa, una pérdida de la masa muscular y de la fuerza y capacidad de ejercicio físico, con una disminución de la densidad mineral ósea, del tamaño de las vísceras, así como una disminución progresiva de las capacidades intelectual y cognitiva (Boix & Picó 2000). Muchos de los individuos ancianos

mueren de aterosclerosis, cáncer o demencia, pero en un número creciente de ancianos muy ancianos (sujetos de más de 100 años de edad), la pérdida de la fuerza muscular es el factor determinante para su nivel de dependencia hasta su fallecimiento (Van den Beld 2003).

La discapacidad asociada a la edad se caracteriza por una debilidad generalizada, dificultad para la movilidad y el equilibrio y poca resistencia. En los más ancianos, este estado es denominado fragilidad física. La fragilidad se ha definido como: "Estado de una vulnerabilidad aumentada a estresores que resulta en una disminución de las reservas fisiológicas y una disregulación multisistémica, una capacidad limitada a mantener la homeostasis y a responder a estresores internos y externos" (Fried et al 2004). La fragilidad se desarrolla en relación a tres dominios: el cognitivo, el funcional y el social. La fragilidad física o funcional se asocia a una pérdida de peso y sarcopenia, debilidad y disminución de la fuerza muscular, baja resistencia, disminución de la actividad motora (disminución de la velocidad al caminar y del equilibrio) y física, como marcadores de menor gasto energético (Fried, Ferrucci, Darer, Williamson, & Anderson 2004). Sin embargo, las definiciones de fragilidad son múltiples, incluyendo otros dominios, lo que implica la gran disparidad en la prevalencia de fragilidad en la población en función de los criterios empleados, variando desde el 4% al 59,1% en una misma población (Clegg, Young, Iliffe, Rikkert, & Rockwood 2013). En cualquier caso, múltiples estudios parecen demostrar de forma concordante una mayor prevalencia de fragilidad en mujeres en comparación con los hombres, en población blanca, residentes en el sur de Europa, hispanos y afro-americanos (Santos-Eggimann et al 2009; Espinoza et al 2012), así como un aumento progresivo con la edad (65-69 años, 4%; 70-74 años, 7%; 75-79 años, 9%; 80-84 años, 16%, ≥85 años, 26%).

Algunos individuos presentan grandes alteraciones en las funciones fisiológicas que conducen a situaciones de dependencia, mientras que en otros su condición es más saludable, llevando a una senectud robusta y exitosa ("successful aging" en terminología anglosajona); esto apoya la idea de una base genética -como mínimo en parte- para el envejecimiento saludable. El concepto de "successful aging" viene definido por Rowe como "el mantenimiento del estado cognitivo y la capacidad funcional física, evitando las enfermedades y la discapacidad y manteniendo un compromiso activo con la vida" (Rowe & Kahn 1998). En nuestro entorno dicha proporción de ancianos robustos o saludables se halla en torno al 30% (Puig-Domingo et al 2008). Buena parte del proceso de envejecimiento es multifactorial y está probablemente regido por la existencia de factores genéticos, pero también de factores ambientales (como

estilos de vida saludables, posibilidad de acceso a la atención médica, una vida poco sedentarizada y socialmente activa) en combinación con mecanismos epigenéticos, que regularían la expresión de genes en las células y podría ser especialmente importante en el envejecimiento (Kirkwood 2005; McGowan & Szyf 2010). Asimismo, con el envejecimiento se producen cambios en la composición corporal que pueden estar condicionados por cambios en el sistema endocrino.

El envejecimiento se asocia también a un aumento de marcadores inflamatorios (proteína C reactiva, citoquinas inflamatorias como la interleuquina-6 (IL-6) entre otras) y de marcadores protrombóticos (dímero-D). Estos marcadores biológicos se correlacionan con un aumento de alteraciones metabólicas, discapacidad, fragilidad y/o mortalidad. Tres ejes hormonales muestran un descenso de los niveles hormonales circulantes durante el envejecimiento normal: gonadotropo (estrógenos en la menopausia y testosterona en la andropausia), dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato (DHEAs) en la adrenopausia y la hormona de crecimiento (GH)/insulin-growth factor-I (IGF-I) en la somatopausia (Lamberts et al 1997). Algunos estudios que han valorado determinados marcadores endocrinológicos e inflamatorios en relación a la fragilidad, han encontrado que niveles altos de proteína C reactiva, niveles bajos de 25-hidroxi-vitamina D3 y de IGF-I se asocian a una mayor prevalencia y/o incidencia de fragilidad (Puts et al 2005). Otros estudios han confirmado que los niveles bajos de GH e IGF-I asociados al envejecimiento se asocian a baja masa muscular y disminución de la capacidad funcional, las cuales se relacionan estrechamente con la fragilidad (Morley et al 2006; Walston et al 2006). El papel de la disregulación hormonal tanto de los ejes somatotropo, adrenal y gonadal en la sarcopenia y la osteopenia todavía no están totalmente aclarados, pero todo parece indicar que se trata de un proceso complejo e interrelacionado. La presencia de una disregulación endocrino-inmunológica, con una disminución de los niveles de estrógenos y andrógenos, contribuiría a un aumento de las citoquinas citoclásticas óseas locales, seguido de osteoclastogénesis y pérdida ósea. La disminución de las hormonas gonadales y de IGF-I, combinado con un aumento de las citoquinas inflamatorias, disminución de la 25-hidroxi-vitamina D3 y un estado protrombótico, aumentarían el riesgo de sarcopenia y fragilidad (Joseph et al 2005).

1.1. EL SÍNDROME METABÓLICO EN LA SENECTUD

Con la edad se produce un aumento de las citoquinas proinflamatorias, que llevan a un estado crónico proinflamatorio, que podría ser causa o efecto de un aumento de la prevalencia de

anomalías metabólicas como la obesidad, dislipemia, hipertensión, resistencia a insulina y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Juntas, estas anomalías constituyen el síndrome metabólico (SM) (Das 2004). Todos estos componentes del SM individualmente y el SM como tal, están asociados a un aumento del riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (ECV), ictus, DM2 y otras enfermedades relacionadas con la edad (Haffner 2006;Kwon et al 2006). Se desconoce cuál de estos factores contribuye en mayor medida al desarrollo de SM, pero parece que la obesidad y la resistencia a la insulina juegan un papel importante. De hecho, el acúmulo de masa grasa se asocia a una elevación de marcadores inflamatorios. El tejido adiposo, y en particular la grasa visceral, hoy en día son considerados como verdaderos órganos endocrinos, ya que los adipocitos segregan una multitud de adipocinas capaces de modular el balance energético del organismo, el metabolismo de la glucosa y lipídico, la respuesta inmune y la función reproductora (Yudkin et al 1999;Rajala & Scherer 2003). Estas alteraciones en el metabolismo y en la distribución de la grasa corporal relacionadas con la edad son participantes activos en el desarrollo de un círculo vicioso que puede acelerar el proceso de envejecimiento y propiciar ciertas enfermedades.

En humanos, el aumento de la adiposidad típicamente se produce entre la tercera y la séptima década de la vida. Estudios tomográficos han mostrado que con la edad disminuye la grasa subcutánea, mientras que la grasa visceral aumenta. Esta acumulación de grasa visceral se asocia de forma causal a mayor resistencia a la insulina y al desarrollo de DM2, y supone un factor de riesgo independiente de enfermedad arterial coronaria, ictus y muerte (Folsom et al 1993).

El SM se presenta con una prevalencia creciente con la edad; en Estados Unidos, la prevalencia de SM se cifra en la actualidad en 6,7% en personas de 20-29 años, 43,5% entre 60-69 años y de 42% en ≥ 70 años (Ford et al 2002). Su presencia a partir de dichas edades puede influir decisivamente en la progresión de los fenómenos de envejecimiento condicionando que éstos evolucionen hacia fenotipos más frágiles, dado que el SM afecta al organismo globalmente y da lugar a alteraciones funcionales y estructurales de índole generalmente irreversibles. La pérdida de buena parte de mecanismos reguladores durante la senescencia puede propiciar unas condiciones de homeostasis hormonal y energética que faciliten el desarrollo de SM. Sin embargo, la frontera entre lo fisiológico y lo fisiopatológico es difícil de establecer en la senectud. Es conocida la progresiva aparición de resistencia a la insulina con la edad y los factores determinantes de su aparición pueden ser tanto extrínsecos

(cambios en la actividad física y ganancia ponderal frecuentes en población del mundo occidental a partir de los 50 años o incluso antes), pero también a un componente poligénico propio de cada individuo. Se conoce relativamente poco en relación a los distintos genes que puedan estar implicados, pero probablemente el número de los mismos puede ser muy elevado, así como la posible interacción de los mismos entre ellos o la interacción de éstos con los fenómenos medioambientales. Ello puede explicar en parte la notable variabilidad en la prevalencia de SM que se ha reportado en distintas poblaciones, que varía, como ya hemos indicado, entre el 30 y el 50%, y con claras diferencias en muchos casos entre hombres y mujeres. En el Estudio de Envejecimiento de Mataró, encontramos una prevalencia global del 50% o del 58% al utilizar los criterios de Adult Panel Treatment (ATP III) o International Diabetes Federation (IDF) respectivamente, con mayor prevalencia en mujeres y una tasa de mortalidad relativamente baja en torno al 9% en hombres y 5,6% en mujeres, en su mayoría por eventos cardiovasculares (Rueda et al 2008). Esta alta prevalencia de SM se debe en esta cohorte a la elevada prevalencia de obesidad central (98,2% por criterios de IDF y 68,1% por criterios de ATP III), de hipertensión (87,9%) y de glucosa alterada o diabetes (51,7%). A pesar de la alta prevalencia de SM, no se encontró correlación de ésta con la presencia de ECV activa, ni tampoco con ninguno de los componentes del SM. Ninguna de las dos definiciones de SM mostró una capacidad distinta para identificar a los sujetos con mayor riesgo cardiovascular (CV). En la actualidad existe controversia sobre si las definiciones establecidas por la IDF o por la del ATP III para SM son realmente válidas para personas ancianas, dado que parte de los factores que constituyen el SM, como es la tendencia a obesidad central, pueden formar parte de los cambios fisiológicos propios de la senectud, por lo que en todo caso podría ser necesario replantear ciertos puntos de corte definitorios de los componentes individuales del SM específicos para sujetos de más de 70 años. Así, estudios en población japonesa sugieren la necesidad de utilizar puntos de corte para el perímetro de cintura específicos para edad y sexo, y también para etnia (Yokoyama et al 2009; Matsushita et al 2012; Matsushita et al 2013; Okazawa et al 2013).

1.2.SARCOPENIA Y ENVEJECIMIENTO

La sarcopenia es un síndrome caracterizado por la pérdida progresiva y generalizada de masa de músculo esquelético y fuerza, con un incremento del riesgo de discapacidad física, mala calidad de vida y muerte (Cruz-Jentoft et al 2010). La prevalencia de sarcopenia es variable en función de la literatura y su definición, pero se estima que está en torno al 5-13% en los

individuos de 60-70 años y del 11-50% en los mayores de 80 años (Morley 2008); afecta a más de 50 millones de individuos hoy en día y afectará a más de 200 millones en los próximos 40 años. Existen múltiples factores implicados en el desarrollo y progresión de la sarcopenia. Entre estos factores destacan factores primarios relacionados con la edad (apoptosis, disfunción mitocondrial), factores endocrinos (hormonas sexuales, glucocorticoides -GC-, GH, IGF-I, disfunción tiroidea, resistencia a insulina), enfermedades neurodegenerativas (pérdida de neuronas motoras), caquexia, malabsorción o malnutrición y discapacidad física o inmovilidad, entre otros, que llevarían a alteraciones en la síntesis proteica, proteólisis y de la integridad neuromuscular. En condiciones normales, la homeostasis de la musculatura está sujeta a un delicado balance entre la formación de células musculares nuevas, hipertrofia, y pérdida proteica. Este equilibrio está regulado por el cerebro y los sistemas endocrino e inmune, y se ve influido también por factores nutricionales y la actividad física. Cambios en los componentes neurológico, inmunológico y endocrino pueden alterar este equilibrio y acelerar el desarrollo de sarcopenia. Citoquinas inflamatorias, incluyendo la IL-6 y el tumor necrosis factor α -TNF α -, activan la citomiolisis para generar aminoácidos y obtener energía. Esta respuesta adaptativa/protectora puede estar hiperactivada en situaciones de fragilidad, llevando a una pérdida neta de masa muscular y fuerza, con una disminución asociada de la capacidad funcional (Cruz-Jentoft et al 2010; Morley 2008).

La sarcopenia está íntimamente relacionada con otros conceptos como el de caquexia y el de fragilidad, solapándose y coincidiendo en muchos casos. Muchos ancianos frágiles presentan al mismo tiempo sarcopenia, y otros individuos ancianos sarcopénicos son también frágiles. Sin embargo, el concepto de fragilidad va más allá de los factores físicos, e incluye asimismo los ámbitos psicológico y social, el estado cognitivo, el apoyo social y factores ambientales. Otro concepto interesante relacionado es el de obesidad sarcopénica, donde hay una pérdida de la masa magra con el mantenimiento o aumento de la masa grasa (Prado et al 2008). A pesar de que el peso cambia poco en un mismo individuo, existen ciertos patrones de cambios en composición corporal relacionados con el envejecimiento. En el hombre anciano, el porcentaje de masa grasa aumenta inicialmente, y posteriormente se mantiene o decae. Estos cambios se atribuyen a un descenso acelerado en la masa magra, con un aumento inicial de la masa grasa y su posterior descenso. Las mujeres muestran un patrón similar. La grasa visceral e intramuscular aumentan con la edad mientras que la grasa subcutánea disminuye (Hughes et al 2004; Goodpaster et al 2006). Varios estudios han relacionado el SM con la discapacidad física en la senectud. Los ancianos con SM tienen una mayor limitación funcional, una menor

fuerza muscular y una menor masa muscular en las extremidades inferiores que los ancianos sin SM (Penninx et al 2009;Vieira et al 2013). Sin embargo, algunos estudios en sujetos de más de 75 años han mostrado una asociación entre SM y mejor calidad de vida, especialmente en hombres (Laudisio et al 2013). Una posible explicación para esta asociación es que los individuos con SM no tendrían otros factores de riesgo asociados a peor calidad de vida, como disfunción hepática, malnutrición o caquexia. Esto pone en duda una vez más el uso adecuado del término SM para caracterizar a la población anciana y conocer su situación de riesgo CV, fragilidad y supervivencia, como ya se comentó previamente.

La composición corporal cambia a lo largo de la vida, existiendo un aumento gradual del peso corporal desde la edad adulta hasta los 60-65 años y a partir de los 65-75 años una disminución variable del mismo. Esta pérdida de peso asociada a la edad suele tratarse de una pérdida de peso no intencional o involuntaria, y se acepta que se trata de un problema específico en y del envejecimiento. Se estima que la prevalencia de esta pérdida involuntaria de peso puede ser superior al 27% en poblaciones de alto riesgo y ocurre fundamentalmente en forma de pérdida de masa muscular dando lugar a la sarcopenia, que condiciona así mismo pérdida de fuerza, fragilidad, mayor riesgo de fracturas óseas, mayor riesgo de caídas y de ingresos hospitalarios, alteraciones inmunológicas (mayor riesgo de infecciones), retraso en la recuperación (pérdida de función cognitiva, deshidratación, aumento del riesgo de úlceras de decúbito, disminución de la capacidad respiratoria, aumento de la estancia media hospitalaria) y muerte prematura (Chapman et al 2002;Cornali et al 2005;Serra-Prat et al 2010;Landi et al 2012). Sin embargo, la relativa estabilidad en el índice de masa corporal (IMC) durante este periodo puede enmascarar la pérdida de masa magra, por aumento de la masa grasa. La pérdida de peso con el envejecimiento ocurre básicamente como consecuencia de un progresivo descenso de la ingesta energética, a pesar de acompañarse de una reducción en el gasto energético por una disminución de la actividad física y del metabolismo basal debido a una disminución de la masa metabólicamente activa (Roberts et al 1995;de Groot et al 2000) .

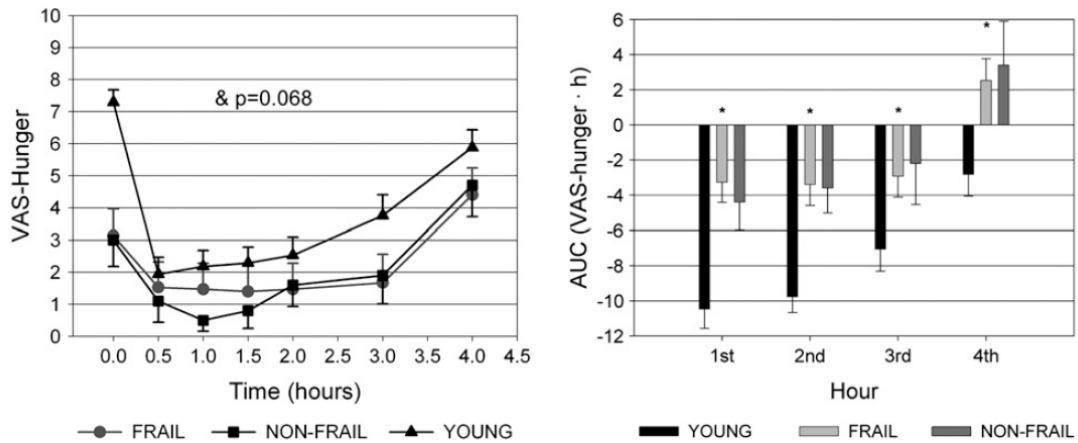
1.3.ANOREXIA DEL ENVEJECIMIENTO

La disminución del apetito y la ingesta es frecuente en el envejecimiento, y a menudo se denomina “anorexia del envejecimiento”. En torno a un 4,3% de los individuos de más de 65 años que mantienen autonomía funcional están malnutridos, y más de un 37% de los ancianos institucionalizados presentan malnutrición proteica (Morley 1998). Los mecanismos por los

cuales se produce una menor ingesta energética que llevan a la anorexia del envejecimiento no están claros, pero se trata de un tema de gran interés científico y médico ya que podría resultar clave para desarrollar futuros tratamientos o estrategias preventivas para evitar la pérdida de peso y los cambios en la composición corporal asociados al envejecimiento, que suponen un alto riesgo de malnutrición, fragilidad y caídas. Estas estrategias podrían favorecer un envejecimiento saludable y promover la salud de las personas ancianas, para añadir vida de calidad a los años y no sólo años a nuestras vidas.

El apetito y la saciedad están íntimamente regulados por mecanismos centrales y periféricos de extraordinaria complejidad y difícil estudio, así como por factores ambientales que influyen en la homeostasis energética. Estos sistemas pueden ser inefectivos durante el envejecimiento. En el adulto joven, tras un periodo de infraingesta se produce un periodo de aumento voluntario de la ingesta para compensar. El anciano es incapaz de regular la ingesta en esta situación. Mientras que el adulto joven es capaz de reganar el peso perdido durante un periodo de infraingesta y de perderlo después de un periodo de sobreingesta, un anciano, en cambio, sólo gana un 60% del peso que perdió durante un periodo de infraingesta y únicamente consigue perder el 30% del peso que ganó durante un periodo de sobreingesta (Roberts, Fuss, Heyman, & Young 1995). Un estudio de Rolls et al (Rolls et al 1995) demostró que las personas mayores no pueden regular la ingesta disminuyendo la misma tras un episodio previo de sobreingesta, a diferencia de los jóvenes que sí pueden. Esto sugiere que los mecanismos implicados en la regulación de la conducta alimentaria están alterados en la senectud. En el Estudio de Envejecimiento de Mataró, se comprobó que la sensación de hambre tras el ayuno era superior en los jóvenes que en los ancianos, y que tras la ingesta de 380 Kcal, los jóvenes experimentaron una más temprana y mayor recuperación del hambre que los ancianos, a los 30 min, 1 y 3 horas tras la ingesta (Serra-Prat et al 2009b) (figura 1).

Figura 1. Media (\pm DE -desviación estándar-) del apetito medido por la escala analógica visual (VAS -visual analog scale-) durante las 4 horas posteriores a un desayuno de 380 kcal. Se observan diferencias significativas entre los jóvenes y los ancianos sin mostrarse diferencias entre los ancianos frágiles y los no frágiles (Serra-Prat, Palomera, Clave, & Puig-Domingo 2009b).



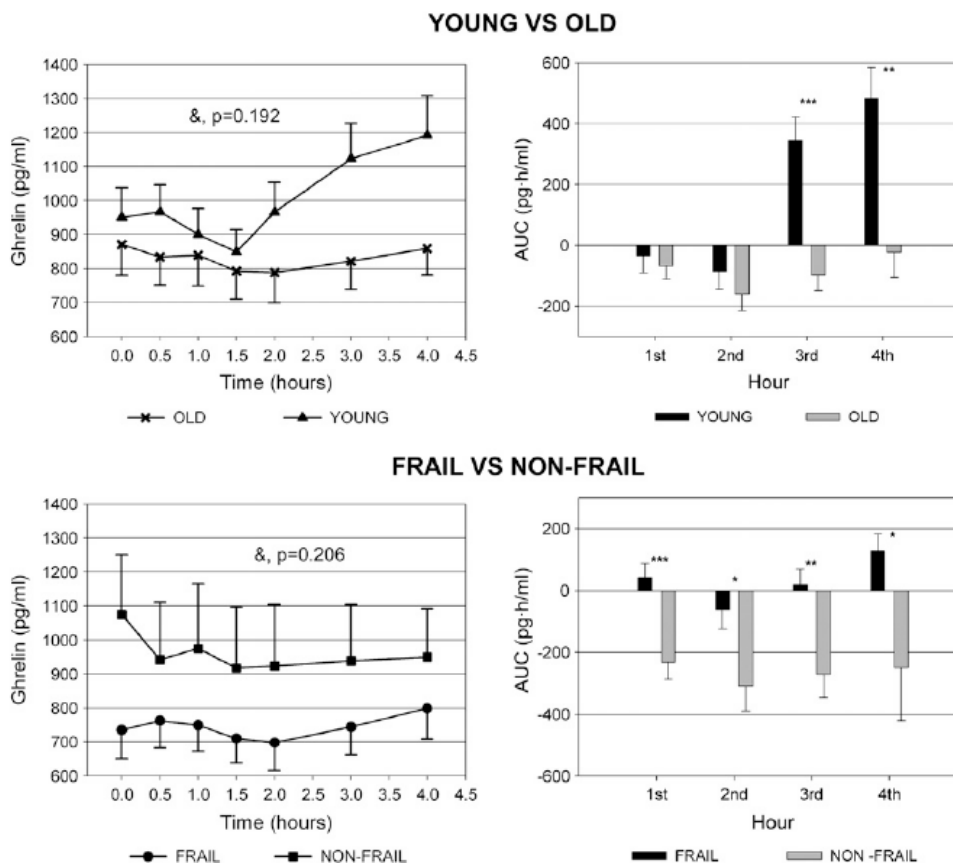
Sin embargo, los mecanismos por los cuales la homeostasis energética en los ancianos parece estar alterada todavía no están claros. Probablemente se debe en parte, a que estos mismos mecanismos no se conocen completamente en las personas sanas, pero también a que estos mecanismos pueden estar alterados en buena parte de la población, propiciando un exceso de ingesta energética y el consiguiente desarrollo de sobrepeso y obesidad en la población joven. La complejidad de la anorexia del envejecimiento se debe a que el balance energético es un fenómeno multifactorial regulado por complejos mecanismos centrales y periféricos. La saciedad está regulada por múltiples factores, entre los que se incluyen estímulos olfatorios, señales originadas en el estómago e intestino delgado proximal, nutrientes (glucosa, aminoácidos), metabolitos (lactato, piruvato, cetonas) y modificaciones de ciertas hormonas gastrointestinales como la colecistokinina (CCK) y el glucagon like peptide-1 (GLP-1) y la ghrelina, entre otras, en respuesta a la ingesta. Estas señales tienen efectos indirectos en los mecanismos centrales, por vía de activación de fibras vagales aferentes, o efectos directos a través de la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, todos estos mecanismos están también influidos por el ambiente, especialmente el ambiente obesogénico de las sociedades desarrolladas y la etiología de que la anorexia del envejecimiento está asociada a múltiples

fallos en los procesos de regulación fisiológica de la homeostasis energética. Dentro de estos múltiples mecanismos alterados tenemos (Atalayer & Astbury 2013):

- Efectos gástricos: disminución de la secreción de ácidos gástricos, disminución del vaciado gástrico.
- Señales del intestino: niveles altos de CCK se asocian con una disminución de la cantidad y duración de la ingesta, mayor percepción de plenitud y menor apetito; algunos estudios sugieren que con la edad aumentan los niveles de CCK, disminuyendo la ingesta y resultando en una pérdida de peso (MacIntosh et al 1999). En el Estudio de Envejecimiento de Mataró se observó que los niveles basales de CCK eran similares en los adultos jóvenes y ancianos, sin embargo, en los adultos jóvenes, los niveles de CCK aumentaron x3 a los 30 minutos de la ingesta, en comparación con los ancianos, que aumentaron x2, con diferencias significativas en el área bajo la curva entre jóvenes y ancianos (Serra-Prat, Palomera, Clave, & Puig-Domingo 2009b). El GLP-1 se sintetiza en el intestino delgado y reduce la ingesta, retrasa el vaciado gástrico y reduce el peso; algunos estudios han encontrado un aumento de los niveles de GLP-1 tras la ingesta en mujeres ancianas en comparación con las jóvenes, sugiriendo que los niveles elevados de GLP-1 pueden contribuir a la pérdida de apetito en el envejecimiento (Ranganath et al 1998). El aumento preprandial de ghrelina se cree que tiene un importante papel en el inicio de la ingesta. Varios estudios, entre ellos el Estudio de Envejecimiento de Mataró, han demostrado niveles inferiores de ghrelina en la senectud (Serra-Prat et al 2007), así como cambios en el patrón de secreción tras la ingesta en función del grado de fragilidad (Serra-Prat, Palomera, Clave, & Puig-Domingo 2009b) (figura 2). El péptido YY (PYY) disminuye tras la ingesta, su papel en el envejecimiento no está claro, pero algunos estudios indican que sus niveles disminuyen con la edad, lo que puede influir en la ingesta energética (li-Rachedi et al 1984).
- Señales del tejido adiposo: la leptina es una hormona anorexigénica secretada por el tejido adiposo en proporción a los niveles de adiposidad y podría jugar un papel en la anorexia del envejecimiento, ya que se han descrito niveles más elevados en ancianos respecto a jóvenes con el mismo IMC (Zamboni et al 2004). La adiponectina se correlaciona positivamente con la edad y negativamente con el IMC (Cnop et al 2003).
- Señales del páncreas: la insulina es una de las principales hormonas involucradas en el metabolismo de la glucosa y una de las señales de saciedad que actúan a nivel central para reducir la ingesta; existen datos controvertidos respecto a las diferencias en niveles de insulina con la edad, pero se ha reportado que en ancianos, los niveles en

individuos bien nutridos son superiores que en los malnutridos y que en los jóvenes bien nutridos (Sturm et al 2003). El glucagón disminuye la ingesta energética contribuyendo a la saciedad, pero no se han encontrado diferencias en los niveles de glucagón tras la ingesta entre ancianos y jóvenes tras ingestas pequeñas aunque sí niveles postsprandiales de glucagón superiores en ancianos, tras grandes ingestas (Melanson et al 1998). La administración de amilina disminuye la ingesta en pacientes obesos, pero no parece haber diferencias en los niveles en relación a la edad (Edwards et al 1996). El polipéptido pancreático (PP) reduce la ingesta energética y el peso, enlenteciendo el vaciado gástrico; sus niveles son mayores en individuos de >35 años y puede inhibir la secreción de agua y electrolitos a nivel intestinal, lo que podría explicar parcialmente el estreñimiento que se observa en el envejecimiento (Gras-Miralles & Cremonini 2013).

Figura 2. Media (\pm DE) de la respuesta de la ghrelina durante las 4 horas posteriores a un desayuno de 380 kcal. Se observan diferencias significativas entre los distintos grupos. *P <0,01; **P<0,001; ***P<0,001 (Serra-Prat, Palomera, Clave, & Puig-Domingo 2009b).



Los mecanismos que regulan la homeostasis energética podrían pues cambiar con la edad, a tenor de todos estos datos. Es posible por lo tanto, que cambios en las señales periféricas de la saciedad (GLP-1, ghrelina, CCK y leptina) afecten los mecanismos centrales de coordinación de la ingesta energética. En los ancianos sanos, las señales del hambre prevalecen sobre las señales de la saciedad, lo que podría favorecer el aumento del IMC hasta los 70-75 años. Sin embargo, a partir de los 75 años, el predominio de los factores determinantes de saciedad prolongada e inhibición del hambre condicionarían un déficit calórico y podría ser una posible explicación para la anorexia del envejecimiento (Atalayer & Astbury 2013).

1.4.EL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento se asocia a cambios estructurales y funcionales fisiológicos en el cerebro. El componente cognitivo de los sujetos frágiles comporta una de las amenazas emergentes del siglo XXI dado el aumento de la esperanza de vida. La pérdida de neuronas en la región cortical es pequeña (Bishop et al 2010), sin embargo, las neuronas con una alta demanda metabólica, como las neuronas piramidales del hipocampo se ven afectadas de forma predominante por cambios en la función sináptica, transporte de proteínas y función mitocondrial. El hipocampo es una importante diana en la fisiopatología del deterioro cognitivo patológico propio de la enfermedad de Alzheimer (EA) y es un componente clave en la respuesta al estrés que transmite información al hipotálamo por retroalimentación negativa. El cerebro en el envejecimiento también se caracteriza por cambios estructurales y funcionales en la microglia, que cumplen funciones propias de los macrófagos en el SNC. Se activan ante el daño cerebral y la inflamación sistémica, lo que genera una hiperrespuesta a pequeños estímulos, en particular durante el envejecimiento, lo que podría causar daño y muerte neuronal. Estudios observacionales han objetivado una asociación temporal entre fragilidad, deterioro cognitivo y demencia. Se ha demostrado de forma consistente que la fragilidad se asocia a un mayor riesgo de desarrollo de deterioro cognitivo moderado en estudios prospectivos a 12 años de seguimiento (Boyle et al 2010).

La mayor parte de datos publicados hasta la actualidad sugieren que los estrógenos ejercen un papel clave a nivel neuroprotector en mujeres, retrasando el proceso de neurodegeneración. Así, se ha postulado que el tratamiento hormonal sustitutivo (THS) durante la menopausia mejora rápidamente los síntomas climatéricos, a la vez que se observa también una mejoría en

la memoria verbal, vigilancia, razonamiento, sin cambios en otras funciones cognitivas (Lamberts 2002). Sin embargo, el uso prolongado del THS en las mujeres menopáusicas es controvertido, ya que frente a los posibles beneficios en los tres desórdenes más frecuentes en las mujeres en el envejecimiento (ECV, osteoporosis y demencia), existe un riesgo aumentado de cáncer de mama, trombosis e ictus (Beral 2003). En los hombres, la aromatización de la testosterona a estradiol a nivel del cerebro, proporciona niveles constantes de dicho neurocompuesto. En un elegante estudio, Dubal et al (Dubal et al 2001) demostró que en los ratones “Knock out” para el receptor alfa de estrógenos, la ausencia del mismo elimina completamente las acciones de protección de estradiol en todas las regiones del cerebro, mientras que dicha capacidad protectora está totalmente conservada en la ausencia del receptor beta si se preserva el alfa.

Un metanálisis de estudios observacionales (LeBlanc et al 2001) objetivó que el THS se asocia a un menor riesgo de demencia (odds ratio -OR- 0,66; CI 95%, 0,57-0,82). Sin embargo, los beneficios del tratamiento con estrógenos en mujeres con EA ya diagnosticado son controvertidos. Parece que el papel neuroprotector se asocia particularmente al 17 β -estradiol, que reduce el nivel de proteína precursora amiloide (APP), promueve el crecimiento y supervivencia de las neuronas colinérgicas, aumenta la densidad de las neuronas del hipocampo y aumenta la plasticidad sináptica en el hipocampo, lo que mejora la memoria a corto y largo plazo (Jamshed et al 2014). Los datos disponibles en la actualidad parecen indicar que hay una ventana crítica entre los 50 y 60 años, unos 5 años tras la menopausia, que es cuando los estrógenos tendrían su efecto positivo, en neuronas previamente sanas, pero posteriormente podrían tener incluso un efecto deletéreo (Chen et al 2006). Por otro lado, el uso de estrona como estrógeno dominante parece tener un efecto negativo sobre la cognición, a diferencia de lo que sucede con el estradiol, lo cual ha elevado aún más la controversia sobre la utilización de estrógenos como neuroprotectores (Shumaker et al 2003; Rapp et al 2003). El uso de moduladores selectivos del receptor de estrógenos como el raloxifeno, tienen un efecto beneficioso sobre la densidad mineral ósea y disminuyen el riesgo de cáncer de mama, pero parece no tener efectos sobre la cognición (Lamberts 2002).

En los varones, el hipogonadismo asociado a la edad es más gradual y heterogéneo. Por otro lado, no se han demostrado efectos del tratamiento sustitutivo con testosterona en varones en relación a la función cognitiva (Lamberts 2002).

Se estima que aproximadamente un 30% del total de andrógenos en el varón y un 90% de los estrógenos en la mujer postmenopáusica derivan de la conversión periférica de DHEA/DHEAs. Con el envejecimiento se produce un descenso progresivo de los niveles de DHEAs sin prácticamente cambios en los niveles de cortisol, por lo que el ratio cortisol/DHEAs es mayor en los sujetos ancianos respecto a los jóvenes (Ferrari et al 2001). A pesar de que los niveles de cortisol no se modifican sustancialmente, existe una pérdida del ritmo circadiano con una tendencia al aumento de los niveles por la tarde. Asimismo, el estudio de la regulación del cortisol mediante supresión con 1 mg de dexametasona ha objetivado una falta de respuesta supresora de hasta un 30% en ancianos sanos y un 50% ancianos con demencia (Carroll et al 1981). El cortisol promueve la degeneración neural y su muerte, mientras que la DHEAs juega un papel protector. Debido a los efectos opuestos del cortisol y la DHEAs en el cerebro, y especialmente en el hipocampo, el desequilibrio entre corticoides y andrógenos que ocurre en el envejecimiento fisiológico, y especialmente en el envejecimiento patológico, puede llevar a efectos adversos en estas regiones cerebrales, cuyo papel clave en el aprendizaje y la memoria es bien conocido. Así mismo, la pérdida de neuronas en el hipotálamo, el hipocampo y la región límbica, se asocia a una reducción del número de receptores de GC y una alteración de la regulación adrenocortical. La administración de un bolo de 35 mg de hidrocortisona produce una disminución del 12-16% de la metabolización de la glucosa objetivado por PET (positron emission tomography), mientras que el volumen del hipocampo por RMN (resonancia magnética nuclear) es menor en los pacientes con síndrome de Cushing (McEwen et al 1999; Resmini et al 2013).

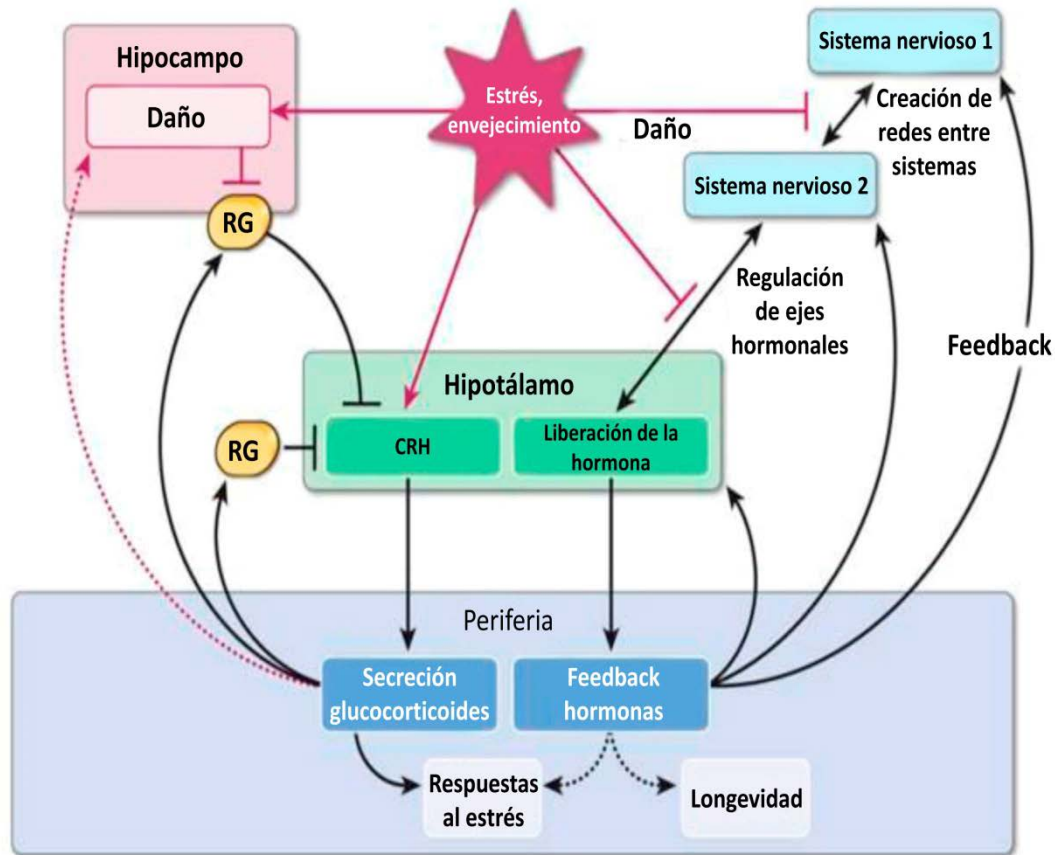
Con respecto al eje somatotropo, los datos son menos concluyentes. La insulina y el IGF-I son neurotróficos y promueven la supervivencia neuronal por inhibición de la apoptosis (van der Heide et al 2006). Se sabe que los adultos tratados con GH por déficit de dicha hormona, presentan aumento de la masa y fuerza muscular, masa ósea y la calidad de vida (Lamberts, van den Beld, & van der Lely 1997). El déficit de GH tanto en niños como adultos, se ha asociado a déficits neuropsicológicos y de memoria. En un estudio prospectivo (Kalmijn et al 2000) se vio que en ancianos sanos, el deterioro cognitivo se asociaba inversamente con los niveles de IGF-I. Sin embargo, todavía no está claro el papel que el eje somatotropo tiene en el declive a nivel de composición corporal, funcional y cognitivo con el envejecimiento, por lo que no hay datos para recomendar el tratamiento de reemplazo con GH para prevenirlo en ancianos no deficitarios de GH. Recientemente se ha descrito un papel neuroprotector de la ghrelina debido a sus efectos extrahipotalámicos, promoviendo el aprendizaje y la memoria,

activando la plasticidad del hipocampo y favoreciendo la recompensa y la motivación (Andrews 2011). Estudios similares se están llevando a cabo para estudiar el papel de la obestatina en el eje somatotropo y en la memoria con resultados positivos.

Cada día hay más datos que sugieren que el sistema nervioso actuaría como un regulador central del envejecimiento mediante la coordinación de la fisiología de los tejidos extraneurales (Bishop, Lu, & Yankner 2010). El hipotálamo actúa como regulador central del metabolismo y del uso de energía, y coordina las respuestas fisiológicas de todo el organismo a través de la señalización hormonal. En ratones, la reducción de la señalización de la GH por parte del eje hipotálamo-hipófisis extiende la vida útil en dicha especie. Además, la sobreexpresión de la proteína de desacoplamiento mitocondrial UCP2 (uncoupling protein 2) en células específicas del hipotálamo murino es suficiente para incrementar la longevidad (Flurkey et al 2001;Conti et al 2006). Estos resultados sostienen que la señalización hormonal del hipotálamo tiene un papel crucial en el control de la longevidad del organismo.

Dicha regulación hipotalámica de ciertas vías hormonales podría tener también un papel en el deterioro cognitivo durante el envejecimiento del cerebro. El hipotálamo coordina las respuestas al estrés, en parte a través de la regulación de la secreción de GC periférica (Jankord & Herman 2008). Además, los GC pueden ser detectados directamente en el hipocampo, que luego suprime la estimulación hipotalámica de la liberación adicional de GC en un bucle de retroalimentación negativa. Sin embargo, la producción excesiva de GC asociada con el estrés crónico o grave puede afectar la función neuronal del hipocampo y predisponer el organismo a la neurodegeneración, y potencialmente interrumpir el circuito regulador que conecta el hipocampo y el hipotálamo. Otros circuitos cerebrales sistémicos aún por descubrir pueden promover la integración de las funciones cerebrales de orden superior con la fisiología sistémica. Por lo tanto, los cambios degenerativos primarios en el cerebro podrían contribuir a la ruptura sistémica en la regulación de GC y otras hormonas cruciales, tales como IGF-I. Estos cambios sistémicos pueden, a su vez, predisponer al individuo a nuevos cambios neurodegenerativos, y a la creación de un ciclo progresivo de disminución fisiológica sistémica y neurológica en particular (Bishop, Lu, & Yankner 2010) (figura 3).

Figura 3. El cerebro como potencial regulador del envejecimiento (Bishop, Lu, & Yankner 2010). Adaptada. RG: receptor de glucocorticoides.



2.GENÉTICA Y EPIGENÉTICA DEL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento se podría definir como una serie de procesos en el tiempo hasta el fallecimiento donde el efecto de factores endógenos y ambientales generan una serie de daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) que se van acumulando (Vijg 2000). La integridad y la estabilidad del ADN está continuamente en riesgo por su interacción con agentes biológicos físicos y químicos exógenos, como las radiaciones ultravioletas, radiaciones ionizantes o productos químicos en la comida, así como por amenazas endógenas, incluyendo errores de replicación del ADN, reacciones hidrolíticas espontáneas y los radicales libres oxidativos. Las lesiones genéticas derivadas de daños extrínsecos e intrínsecos son muy diversas e incluyen mutaciones puntuales, translocaciones cromosómicas, ganancias y pérdidas, acortamiento de los telómeros, y la alteración de genes causada por la integración de virus. Para minimizar

estas lesiones, los organismos han desarrollado una compleja red de mecanismos de reparación del ADN que son capaces de tratar con la mayoría de los daños infligidos al ADN nuclear. Los sistemas de estabilidad genómica también incluyen mecanismos específicos para mantener la longitud apropiada y la funcionalidad de los telómeros y para garantizar la integridad del ADN mitocondrial (Lopez-Otin et al 2013). De modo que deficiencias en la reparación del ADN podrían causar un envejecimiento acelerado. Las mutaciones y deleciones en el ADN mitocondrial también podrían contribuir al envejecimiento. A pesar de que el papel del ADN mitocondrial sigue siendo controvertido debido a la existencia de múltiples genomas mitocondriales, lo que permitiría la coexistencia de genomas “wild-type” y mutantes en la misma célula, existen datos que evidencian que el daño en el ADN mitocondrial podría ser importante tanto en el envejecimiento per se como en las enfermedades asociadas al envejecimiento, ya que en modelos murinos, ciertas mutaciones y particularmente la acumulación de mutaciones puntuales y deleciones en el ADN mitocondrial, se asocian a un envejecimiento prematuro y menor longevidad (Wallace 2005;Kujoth et al 2005) .

Las mutaciones somáticas son poco frecuentes, sin embargo durante el envejecimiento se van acumulando también mutaciones que afectan a una variedad de órganos y tejidos, incluyendo el hígado, cerebro, corazón, intestino delgado y el bazo. La incidencia, así como el espectro de dichas mutaciones, difiere en gran medida de un órgano a otro; mientras que en el intestino se acumulan mutaciones puntuales de forma frecuente con la edad, en el corazón y el hígado también la frecuencia de reordenamientos del genoma es significativamente mayor en la vejez (Dolle et al 2000). La acumulación progresiva de mutaciones somáticas convierte un tejido envejecido en un mosaico de células con diferentes genotipos. Dependiendo de la severidad de la mutación, el tipo celular al que afecta y los factores ambientales existentes, ello puede llevar a un deterioro funcional, enfermedad o también al fenómeno del envejecimiento (Vijg 2014).

Aunque la acumulación del daño del ADN con la edad parece afectar al azar al genoma, hay algunas regiones cromosómicas, tales como los telómeros, que son susceptibles al deterioro relacionado con la edad con una frecuencia superior a la esperable por simples fenómenos de azar (Blackburn et al 2006). Las ADN polimerasas pierden la capacidad para replicar completamente los extremos terminales de las moléculas de ADN lineales, una función realizada por una ADN polimerasa específica, la telomerasa. Sin embargo, la mayoría de las células somáticas de mamíferos no expresan telomerasa, y esto conduce a la progresiva

pérdida acumulada de las secuencias terminales del cromosoma. El agotamiento de los telómeros explica la capacidad de proliferación limitada de algunos tipos de células cultivadas in vitro, y por otro lado, la expresión ectópica de telomerasas puede conferir inmortalidad a células mortales sin causar una transformación oncocítica (Bodnar et al 1998). Es importante destacar que el acortamiento de los telómeros es también observado durante el envejecimiento normal, tanto en humanos como en ratones (Blasco 2007). En ratones también se ha visto que el acortamiento o elongación de los telómeros muestran un correspondiente acortamiento o alargamiento de la longevidad respectivamente (Armanios et al 2009) y que el envejecimiento se podría modular y retrasar con la activación de las telomerasas (Jaskelioff et al 2011).

Asimismo, una gran variedad de alteraciones epigenéticas afecta a todas las células y tejidos a lo largo de la vida. Estos cambios epigenéticos implican alteraciones en los patrones de metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de las histonas y la remodelación de la cromatina. El aumento de la acetilación de histonas H4K16, de la trimetilación de H4K20 o H3K4, así como la disminución de la metilación H3K9 o H3K27 constituyen marcas epigenéticas asociadas a la edad (Fraga & Esteller 2007; Han & Brunet 2012). Los múltiples sistemas enzimáticos que aseguran la generación y mantenimiento de los patrones epigenéticos incluyen metiltransferasas de ADN, histonas acetilasas, desacetilasas, metilasas y desmetilasas, así como los complejos de proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina. Se ha visto en invertebrados que la delección de componentes de los complejos de la metilación de histonas se asocian a mayor longevidad y que la inhibición de las desmetilasas de histonas alarga la esperanza de vida a través de vías de señalización de insulina/IGF-I (Lopez-Otin, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer 2013). En relación a la metilación, los datos actuales sugieren que el proceso de envejecimiento está asociado a una situación de hipometilación global, sin embargo algunos loci incluyendo algunos que corresponden a genes asociados a supresión de tumores se hipermetilarían con la edad (Maegawa et al 2010). Todos estos cambios epigenéticos conllevan cambios en la arquitectura de la cromatina, como la pérdida y redistribución de la heterocromatina, que constituyen datos característicos de la edad (Oberdoerffer & Sinclair 2007).

Por otro lado, existen polimorfismos o mutaciones que reducen la función de la GH, el receptor de IGF-I, el receptor de insulina o efectores intracelulares aguas abajo tales como AKT, mTOR, y FOXO, que se han relacionado con la longevidad, tanto en humanos como

modelos animales, y que ilustra además el mayor impacto de las vías tróficas y bioenergéticas sobre la longevidad (Fontana et al 2010;Barzilai et al 2012).

Uno de los genes más recientemente estudiados implicados en el envejecimiento es el gen *Klotho*, que codifica para una proteína transmembrana de 1012 aminoácidos (aa) en humanos, con un pequeño dominio citoplasmático y un dominio extracelular. Se expresa predominantemente en el riñón (la mayor fuente), cerebro, neuronas del hipocampo, células de Purkinje, en el corazón, gónadas, placenta, hipófisis, paratiroides y páncreas. Se ha visto que los ratones con déficit de expresión de *klotho* presentan un síndrome que asemeja al envejecimiento, con menor longevidad, atrofia de piel prematura, osteopenia/osteoporosis, hipopituitarismo con déficit de GH y retraso de crecimiento, hipogonadismo hipogonadotropo, atrofia de genitales, de timo y músculo, arterioesclerosis, calcificaciones ectópicas, enfisema pulmonar y desórdenes neurodegenerativos, así como déficit de memoria de retención. Desde un punto de vista bioquímico, el déficit de *klotho* se asocia a hiperfosfatemia con aumento de 1,25-hidroxi-vitamina D3 y aumento de FGF23 (fibroblast growth factor 23) con resistencia a FGF23 y a hipoglicemia con baja insulina. Se ha postulado que el producto del gen de *Klotho* forma parte de la vía de señalización que regula el envejecimiento y la morbilidad en las enfermedades asociadas a éste. También inhibe la señalización insulina/IGF-I, lo que podría incrementar la resistencia al estrés oxidativo, y a contribuir a las propiedades anti-envejecimiento de *Klotho*. Mantiene la función endotelial y la producción de óxido nítrico, aumenta la tolerancia al estrés, disminuyendo el estrés oxidativo y la apoptosis de las células endoteliales. Mutaciones germinales o polimorfismos en *Klotho* no parecen predisponer a neoplasias y se ha visto que la pérdida funcional de *Klotho* por silenciamiento epigenético favorece la progresión tumoral en una variedad de tumores (Schmid et al 2013).

De modo que, según Perls, la habilidad para alcanzar edades muy avanzadas en estado de buena salud es probablemente una combinación de un estilo de vida saludable, el factor suerte o azar, la ausencia de variantes genéticas que predispongan a enfermedades y la posesión de genes que favorezcan la longevidad (Perls et al 2002). Se ha propuesto una clasificación para los genes asociados a la longevidad, de tal manera que se clasificarían en genes que causan o favorecen el envejecimiento (como la longitud de las telomerasas y p53), genes que alteran la longevidad porque aumentan el riesgo de enfermedades específicas del envejecimiento, genes que influyen o causan enfermedades relacionadas con la edad (como la enfermedad de Alzheimer y la apolipoproteína E ϵ -4), variantes genéticas que aumentan la

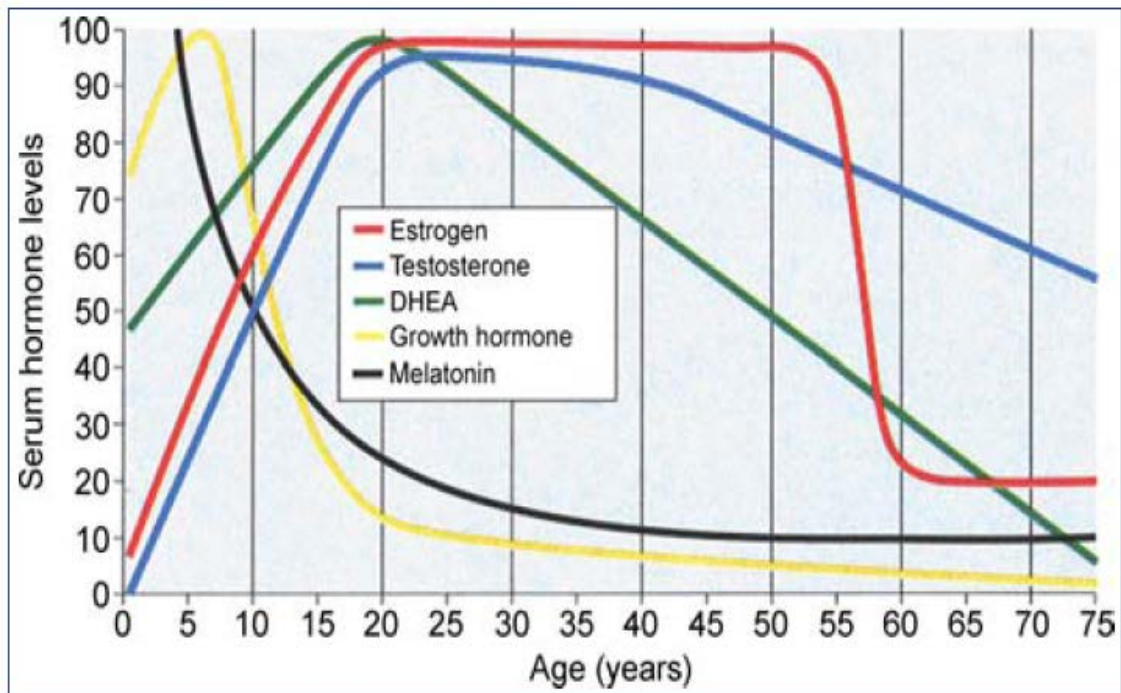
esperanza de vida posiblemente enlenteciendo el envejecimiento (como sir-2 -silent information regulator-2-), así como polimorfismos genéticos que influyen en el envejecimiento a través de la regulación de la inestabilidad genómica como la reparación del ADN, o la expresión génica, la proliferación celular y la senescencia (Perls, Kunkel, & Puca 2002).

3.ENDOCRINOLOGÍA DEL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento produce cambios en la cantidad, composición celular y función del tejido endocrino secretor que lleva a una disminución de la respuesta al estrés y a una activación de sistemas de regulación orientados a compensar la pérdida de función, como por ejemplo el mantenimiento de la función gonadal mediante un aumento de la secreción de la hormona luteinizante (LH) y una disminución del metabolismo de la testosterona. Anatómicamente se produce cambios comparables en todas las glándulas endocrinas: cada glándula disminuye de tamaño y desarrolla áreas de atrofia que se acompañan de cambios vasculares y de fibrosis (Boix & Picó 2000). Desde el punto de vista funcional, durante la senectud se produce un descenso en la actividad de varios sistemas hormonales que pueden tener una influencia notable en la consecución de una mejor condición de salud y de una composición corporal característica durante el envejecimiento: el descenso en la GH (somatopausia), la disminución de la actividad gonadal que lleva a un descenso en los estrógenos y la testosterona (menopausia y andropausia respectivamente) y la disminución de la actividad adrenocortical con menor producción de DHEA y DHEAs (adrenopausia) (figura 4).

El envejecimiento fisiológico de los ejes neuroendocrinos se caracteriza por una alteración de los patrones de secreción hormonal, valorado a través del estudio de los perfiles secretorios hormonales de 24 horas. Por ejemplo, se produce una disminución de la amplitud de los pulsos nocturnos de la LH y la GH y una desaparición de los pulsos diurnos de GH, y alteraciones en la sensibilidad de los ejes LH-testosterona y ACTH-cortisol. Estos cambios preceden a cualquier variación en las concentraciones hormonales en la sangre, lo que realza el impacto de la edad sobre los mecanismos de control que coordinan la secreción hormonal (Veldhuis 1997). Asimismo, el envejecimiento también se asocia a alteraciones en las funciones hipotalámicas de termorregulación, control de la presión arterial y de la sensación de sed, con mayor riesgo de presentar hipotermia, trastornos hidroelectrolíticos e hipertensión arterial sistólica (Boix & Picó 2000).

Figura 4. Porcentaje de descenso en las concentraciones de las principales hormonas en hombres y mujeres, con el envejecimiento (Schreiber & Ziemer 2008).



Dos de los cambios más importantes en la actividad endocrina que se producen durante el envejecimiento afectan al páncreas y al tiroides. Aproximadamente el 40% de los individuos de entre 65-74 años y el 50% de los mayores de 80 años tienen glucosa alterada en ayunas o diabetes, y casi la mitad de estos diabéticos no están diagnosticados (Morley et al 1987; Harris 1990). Estas personas tienen un riesgo alto de desarrollar complicaciones asociadas a la diabetes, especialmente macrovasculares. En ellos, se produce un descenso relativo de la secreción de insulina por las células β , un incremento de la resistencia a la insulina relacionada con la dieta, la inactividad, el aumento de la masa grasa abdominal y descenso de la masa magra corporal, todo lo cual contribuye a un deterioro del metabolismo de la glucosa. Se sospecha que la elevación de la glucosa con la edad facilita su reacción no enzimática con proteínas y ácidos nucleicos formando productos que alteran la función y disminuyen la elasticidad tisular; también se favorece la formación de radicales libres y el aumento de la peroxidación lipídica, que llevan al daño tisular y que se ha asociado a múltiples aspectos del envejecimiento, incluidas enfermedades inflamatorias, cataratas, diabetes y ECV (Boix & Picó 2000). La disfunción tiroidea asociada a la edad es también frecuente en el envejecimiento

(Mariotti et al 1995). Entre un 5 y un 10% de las mujeres ancianas presentan niveles bajos de tiroxina (T4) y elevados de la hormona estimulante de tiroides o tirotrópina (TSH -thyrotropin-stimulating hormone-). Estas alteraciones acostumbran a deberse a causas autoinmunes y suponen una expresión de una enfermedad asociada a la edad, y no propiamente consecuencia del proceso de envejecimiento. El envejecimiento normal se asocia a un descenso ligero en la secreción hipofisaria de TSH, pero especialmente a una disminución de la degradación periférica de T4, y también a una menor concentración circulante de triiodotironina (T3), sin cambios importantes en la T4. Estas modificaciones en los niveles de T3 se producen generalmente dentro del rango de la normalidad -para población adulta joven- y no se asocian a cambios funcionales aparentes durante el envejecimiento.

Los cambios en la sensibilidad de la insulina y la función tiroidea que ocurren en el envejecimiento a menudo son considerados y tratados como enfermedades, aún cuando en algunas circunstancias podrían suponer meros cambios adaptativos. Sin embargo, los cambios producidos en los otros tres sistemas hormonales (somatotropo, gonadotropo y adrenal) durante el envejecimiento "normal", se consideran fisiológicos. Recientemente, se han propuesto estrategias de reemplazo hormonal, pero los resultados siguen siendo controvertidos, y no se ha probado de manera inequívoca si "normalizar" los niveles hormonales en sujetos ancianos que se equiparen a los hallados a los 30-50 años es beneficioso y seguro. Ello indicaría que estos distintos valores circulantes hormonales en sujetos mayores son consecuencia de procesos adaptativos propios de la senectud sin significación patológica.

El cambio más rápido y drástico que se produce en la mujer en torno a los 50 años es la menopausia. La producción cíclica de estradiol que se produce durante la edad reproductiva da paso a una producción muy baja pero constante de estradiol. Clínicamente a menudo se acompaña de cambios vasomotores, alteraciones en el sueño, cambios en la piel y también cambios en la composición corporal. Durante años siempre se ha creído que la menopausia estaba causada por un agotamiento de los folículos ováricos. Una perspectiva alternativa es que los cambios relacionados con la edad en el sistema nervioso central y en el eje hipotálamo-hipofisario inician la transición a la menopausia. Los datos que sugieren que tanto el ovario como el cerebro actuarían como marcapasos en la menopausia son cada vez más sólidos (Wise et al 1996). En el varón, los cambios en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal son más lentos, sutiles y temporalmente heterogéneos. Durante el envejecimiento, se

produce un descenso gradual de la testosterona total y libre (Vermeulen 1991). La andropausia se caracteriza por un descenso del número de células de Leydig testiculares y de su capacidad secretora, así como un descenso en la secreción episódica y estimulada de gonadotropinas.

El segundo sistema hormonal asociado a cambios relacionado con la edad es la producción adrenal de DHEA y DHEAs, que decaen gradualmente con la edad, dando lugar a la adrenopausia (Herbert 1995; Ravaglia et al 1996). Mientras la secreción de DHEA decae progresivamente, la producción de adrenocorticotropina (ACTH) se mantiene prácticamente inmodificada, así como la producción de cortisol, lo que condicionaría una mayor acción del cortisol a edades avanzadas. Igualmente, la mayor o menor sensibilidad a la acción de los GC puede también condicionar un efecto deletéreo a nivel muscular y facilitar el acúmulo de grasa intrabdominal, propiciando así mismo el desarrollo de SM.

El tercer sistema endocrino cuya actividad disminuye progresivamente con la edad es el eje GH/IGF-I (Corpas et al 1993). La secreción de GH decae un 14% aproximadamente, por década, con caídas paralelas de IGF-I. La amplitud y la duración de los pulsos de GH, pero no la frecuencia, disminuyen con la edad; paralelamente, los niveles de IGF-I en ambos sexos caen progresivamente. Esta disminución progresiva de GH y de su factor de acción biológica específico, IGF-I, podrían contribuir a la pérdida de masa muscular y facilitar el acúmulo de grasa abdominal a partir de ciertas edades, viéndose asociada a un peor envejecimiento y a una mayor mortalidad asociada (Brugts et al 2008).

Paralelamente al eje somatotropo, cabría destacar también el papel de la ghrelina y la obestatina, dos hormonas gastrointestinales generadas a partir del procesamiento postranscripcional de su precursor, la preproghrelina (Gualillo et al 2006), un producto del gen de la ghrelina. Ambas hormonas parecen regular la homeostasis energética, la composición corporal y la adiposidad con efectos aparentemente opuestos (Epelbaum et al 2010); mientras la ghrelina se comportaría como una hormona orexigénica (Nakazato et al 2001), la obestatina sería anorexigénica (Zhang et al 2005). Aunque el papel orexigénico de la ghrelina está bien establecido, el de la obestatina sigue siendo controvertido (Nogueiras et al 2007). Asimismo, la ghrelina actúa sobre el eje somatotropo estimulando la secreción de GH a través de un receptor propio, lo que podría contribuir a un mejor estado anabólico durante la senectud.

La melatonina, la principal hormona producida por la glándula pineal, presenta también una disminución de su síntesis y secreción a lo largo de la vida. La pineal, considerada como un regulador cronobiológico tiene una actividad nictameral controlada en buena medida por el núcleo supraquiasmático. La síntesis y la liberación de melatonina son estimuladas por la oscuridad e inhibidas por la luz, presentando su pico máximo entre las 2 y las 4 de la madrugada. A la melatonina se le ha atribuido la propiedad de controlar e invertir el proceso de envejecimiento gracias a un potente efecto antioxidante, de mejorar la actividad sexual, de regularizar el sueño y de activar el sistema inmunitario. La pérdida de su funcionalismo ligada a la edad se ha considerado como un factor etiológico de la disrupción de algunos ritmos biológicos a la vez que un determinante de la disfunción de los mecanismos de inducción del sueño en personas ancianas (Webb & Puig-Domingo 1995).

También se produce una alteración del metabolismo del calcio y del fósforo en el anciano que comporta un mayor riesgo de fracturas osteoporóticas, por disminución de la masa ósea. Con la edad se produce una disminución de la ingesta de calcio y una reducción en su absorción debido a un déficit de vitamina D. La etiología del déficit de la vitamina D en el anciano es multifactorial, participando el déficit nutricional, una menor exposición solar, disminución de la capacidad cutánea de sintetizar su precursor y una reducción de la actividad de la 1 α -hidroxilasa (Holick 2007). Este déficit de vitamina D podría contribuir a la pérdida de masa muscular producida en el anciano, ya que se ha observado una correlación positiva entre la fuerza muscular y los niveles de 1,25-hidroxivitamina D3 en ambos sexos y de la 25-hidroxivitamina D3 en los varones (Bischoff et al 1999).

Se desconoce si los cambios en la función gonadal (menopausia y andropausia) se interrelacionan con los procesos de adrenopausia y somatopausia que ocurren en ambos sexos. Aunque el proceso de envejecimiento no resulta simplemente de una variedad de múltiples déficits hormonales, se ha postulado repetidamente aunque no se ha podido comprobar de forma rigurosa que la intervención médica -farmacológica o no- en los procesos de meno-, andro-, adreno-, o somatopausia podrían prevenir o retrasar de forma eficaz algunos aspectos del proceso de envejecimiento.

4.SOMATOPAUSIA: AFECTACIÓN DEL EJE SOMATOTROPO

El eje somatotropo basa su actividad fisiológica principal en la acción de la GH de producción hipofisaria, que estimula la producción de IGF-I, sintetizada a nivel hepático. La secreción integrada diaria total de GH varía a lo largo de la vida, con niveles puberales de 1,0-1,5 mg/d en comparación con niveles en la vejez de 50 µg/d (Veldhuis et al 1995). Esta disminución empieza en la tercera década de la vida y alcanza una meseta alrededor de los 60-70 años, y se produce fundamentalmente a expensas de la amplitud de los pulsos de la GH y posiblemente también a una disminución de su frecuencia; sin embargo, parece mantenerse el patrón circadiano con niveles 4 veces superiores durante la noche respecto al día (Vermeulen 1987). El descenso de la secreción de GH relacionado con la edad se ha atribuido a una disminución en la secreción de la hormona liberadora de GH (GHRH -growth hormone releasing hormone-), a un aumento del tono somatostatinérgico hipotalámico, un aumento de la sensibilidad del mecanismo de feedback inhibitorio y a una disminución del número de células somatotropas hipofisarias (Kelijman 1991). Por el momento, no hay una evidencia clara de la existencia de un factor periférico inductor o modulador en este proceso de somatopausia y este marcapasos parece estar localizado básicamente en el hipotálamo, ya que las células somatotropas de la hipófisis pueden restablecer su capacidad secretora tras la administración de péptidos liberadores de GH, incluso en los más ancianos. Existen múltiples factores que influyen en la secreción de GH en el envejecimiento: los cambios en la composición corporal relacionados con la edad, la disminución de la producción de esteroides sexuales, la disminución de actividad física, la alteración del patrón de sueño y el estado nutricional suprimen la secreción de GH (Veldhuis, Liem, South, Weltman, Weltman, Clemmons, Abbott, Mulligan, Johnson, Pincus, & . 1995). El aumento de tejido adiposo parece ser un potente inhibidor de la secreción de GH, y especialmente su distribución, de modo que la grasa visceral sería un regulador mayor de la secreción de GH (Veldhuis et al 1991).

El IGF-I es un péptido que estimula el crecimiento del esqueleto, la diferenciación celular y el metabolismo. Influye en la composición corporal y su secreción está regulada por la GH, el estado nutricional, la función hepática, la insulina y otras hormonas (Rietveld et al 2003). IGF-I se correlaciona positivamente con los niveles de testosterona libre en adultos jóvenes, pero no con la testosterona total y negativamente con la globulina fijadora de las hormonas sexuales (SHBG -sex hormone binding globulin-) (Erfurth et al 1996). Además, IGF-I regula la función, mantenimiento y reparación de muchos tejidos (Le et al 2001).

La relevancia de IGF-I en el proceso de envejecimiento todavía no es del todo clara (Rosen & Conover 1997). Parece que hay un rango estrecho de niveles de IGF-I para los ancianos sanos y los frágiles (80-130 ng/ml tanto para hombres como mujeres) y que hay un descenso progresivo de dichos niveles de IGF-I con la edad, tanto en hombres como mujeres (Landin-Wilhelmsen et al 1994; Unden et al 2002). La malnutrición y la depleción proteica pueden llevar a niveles bajos de IGF-I y alterar los niveles circulantes de las Insulin Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs); sin embargo la malnutrición puede aumentar en 2 ó 3 veces la producción de GH por una resistencia relativa de ésta a nivel del receptor y postreceptor. Además, la depleción de algunos micronutrientes como el magnesio, el zinc o la tiamina pueden suprimir los niveles séricos y tisulares de IGF-I (Clemmons & Underwood 1991).

Numerosos estudios sugieren que IGF-I es un importante modulador de la masa y función muscular a lo largo de la vida. Un estudio poblacional con mujeres ancianas sanas y frágiles demostró que los niveles bajos de IGF-I se asocian a peor fuerza muscular cuádriceps, menor velocidad al caminar y mayor dificultad para las tareas asociadas con la movilidad, sugiriendo un efecto causal de las bajas concentraciones de IGF-I en la discapacidad (Cappola et al 2001). En otro estudio con 140 ancianos funcionalmente activos, los niveles bajos de IGF-I se asociaron también a peor fuerza muscular en los cuádriceps (Kostka et al 2000).

El deterioro del eje somatotropo se ha relacionado con un peor envejecimiento y un aumento de la mortalidad (Brugts, van den Beld, Hofland, van der, van Koetsveld, Frystyk, Lamberts, & Janssen 2008). Por otro lado parece que la IL-6 también tiene un papel en el desarrollo de discapacidad en conjunción con las bajas concentraciones de IGF-I, de modo que a mayores niveles de IL-6, mayor discapacidad y mortalidad en los ancianos (Cohen et al 1997; Harris et al 1999) y que esto podría ser debido a un efecto catabólico en el músculo provocando una sarcopenia acelerada. Asimismo, la IL-6 juega un papel en la respuesta inflamatoria, aumentando la síntesis de reactantes de fase aguda hepáticos, como la proteína C reactiva o el fibrinógeno, e inhibiendo otros como la IGF-I, por lo que el tratamiento con IL-6 condicionaría niveles bajos de IGF-I. En consecuencia, tanto la IGF-I como la IL-6 podrían tener un papel en la discapacidad funcional asociada con el envejecimiento. De hecho, existen datos que sugieren esta interrelación con la fuerza muscular, donde los niveles altos de IL-6 se correlacionan negativamente con la fuerza muscular total y de la mano, y que los niveles de IGF-I se correlacionan positivamente con la fuerza muscular total y de la mano, pero sólo ante niveles

bajos de IL-6 (Barbieri et al 2003). Esta interrelación podría deberse a un efecto directo de la IL-6 sobre el músculo y/o a un bloqueo de la IL-6 sobre la síntesis y/o efecto de la IGF-I. Estos datos parecen corroborarse en otros estudios que demuestran que los niveles bajos de IGF-I y altos de IL-6 se asocian a mayor discapacidad y mortalidad en mujeres ancianas (Cappola et al 2003).

Además, datos recientes sugieren también niveles inferiores de IGF-I bioactiva en familiares de personas centenarias, y que los niveles de IGF-I se asocian inversamente a la sensibilidad a la insulina en este grupo (Vitale et al 2012). Sin embargo, los datos en relación a la supervivencia son algo controvertidos. Estudios poblacionales parecen indicar una asociación entre niveles altos de IGF-I y cáncer colorrectal, debido a una acción positiva en las vías de regulación de la proliferación celular (Zecevic et al 2006). Por otra parte, se ha descrito una asociación entre niveles altos de IGF-I bioactiva y mayor supervivencia y menor riesgo CV (Brugts, van den Beld, Hofland, van der, van Koetsveld, Frystyk, Lamberts, & Janssen 2008) y una relación en U inversa entre la IGF-I bioactiva y el número de componentes del SM, y también que la sensibilidad a la insulina y los niveles circulantes de insulina modulan la IGF-I bioactiva (Brugts et al 2010).

La valoración del eje GH/IGF-I en los ancianos es muy complejo y para poder entender mejor las relaciones de dicho eje con la discapacidad asociada al envejecimiento, debe incluirse tanto factores hormonales como no hormonales y el estado nutricional, a la vez que hay que tener en cuenta desde el punto de vista metodológico la realización de varias determinaciones de GH y la valoración de las IGFBPs (Rosen & Conover 1997).

Variaciones en genes relacionados con la vía insulina/IGF-I, además de propiamente los niveles de IGF-I, se han estudiado en relación a la longevidad, enfermedades metabólicas, demencia y cáncer. Diferentes polimorfismos en el gen de IGF-I, así como variantes polimórficas en el gen del receptor de IGF-I, se ha visto que influyen en la actividad del eje somatotropo y en la longevidad, y sus condiciones asociadas (Bonafe et al 2003;Albani et al 2009). Ciertos polimorfismos en el promotor del gen de IGF-I, en concreto los portadores de la variante alélica de 192 pares de bases (pb) en homocigosis, que condiciona una repetición citosina/adenina, muestran menores niveles circulantes de IGF-I y de IGF-BP3 (insulin growth

factor binding protein 3) (Rietveld, Janssen, Hofman, Pols, van Duijn, & Lamberts 2003), lo cual podría condicionar una mayor tendencia a la fragilidad, el desarrollo de SM, DM y de cardiopatía isquémica tal como se ha reportado en el estudio de envejecimiento de Rotterdam (Vaessen et al 2001). Estas asociaciones no se observan para los heterocigotos ni para los no portadores de dicho polimorfismo. Este polimorfismo supone la repetición de los pares de bases citosina/adenosina en la posición -684 de la región promotora (CA)_n dando lugar a microsatélites. Este microsatélite está a 1 kb del inicio de la transcripción y presenta múltiples elementos reguladores. Variaciones alélicas en esta región pueden llevar a cambios en el promotor, que condicionen modificaciones en la transcripción de IGF-I. Este polimorfismo puede estar en desequilibrio con otras secuencias cercanas o dentro del promotor, que modifiquen la estabilidad y la vida media de la IGF-I. Se desconoce cual es la prevalencia de dicho polimorfismo en población española y asimismo en población española anciana con diversa comorbilidad. Dado el efecto anabólico de IGF-I y su disminución con la edad, parece razonable pensar que IGF-I podría influir en la masa muscular y la fuerza, y que los polimorfismos de IGF-I podrían estar relacionados con diferencias en la función muscular y fenotipos metabólicos específicos en el envejecimiento. Varios estudios sobre variantes génicas en la vía de IGF-I han demostrado la influencia de las mismas en la respuesta muscular al entrenamiento. Sin embargo, el papel de este polimorfismo en la composición corporal y el riesgo cardiometabólico todavía no se ha dilucidado.

5.GHRELINA

La ghrelina es un péptido de 28 aminoácidos al que se le une un grupo acil para ser activa (Liu et al 2011) y que fue descubierta y descrita su secuencia por primera vez en 1999 por Kojima (Kojima et al 1999). Se produce fundamentalmente en el estómago, pero también en el intestino, el páncreas, los riñones, el sistema inmunitario (linfocitos), la placenta, los testículos, la hipófisis, el hipotálamo y los pulmones. Se le atribuyen múltiples funciones (van der Lely et al 2004), entre ellas:

- Estimula la secreción de GH: su actividad liberadora de GH es menor que la GHRH y la secreción de ghrelina es pulsátil y se asocia más con la ingesta que con los pulsos de GH.

- Estimula la secreción de prolactina (PRL) y ACTH por acción hipotalámica: en relación a la PRL el efecto es menos edad y sexo dependiente que con GH; sin embargo, el estímulo de

la secreción de ACTH es independiente del sexo, pero asociada a la edad (aumenta en la pubertad, disminuye en el adulto y vuelve a aumentar en el envejecimiento).

- Influye negativamente sobre el eje gonadal, tanto a nivel central como periférico.

- Estimula el apetito y el balance energético positivo.

- Estimula la motilidad gástrica y la secreción ácida.

- Modula la función pancreática exocrina y endocrina y los niveles de glucosa. La ghrelina se expresa en las células α y β pancreáticas. Por un lado, modula negativamente la célula β , produciendo una disminución de la secreción de insulina y un aumento de glucosa. También inhibe el efecto de la insulina en la gluconeogénesis y podría estimular directamente la glucogenólisis por una vía no dependiente de su receptor específico, el receptor de secretagogos de la GH (GHS-R1 -growth hormone secretagogue receptor 1-).

- Juega un papel en la adipogénesis: la administración de ghrelina aumenta los niveles de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), disminuye la lipólisis y estimula la diferenciación de los preadipocitos.

- Es una hormona gastroenteropancreática que regula así mismo el metabolismo del agua.

- Influye sobre el sueño y el comportamiento.

- Tiene un efecto CV: la administración crónica de ghrelina mejora la contractilidad cardíaca, atenúa el remodelado del ventrículo izquierdo, disminuye las resistencias vasculares y aumenta la fracción de eyección, tiene un efecto vasodilatador, y consecuentemente, disminuye la tensión arterial.

- Se le atribuye un efecto en la proliferación celular: a pesar del potencial efecto proliferativo en células neoplásicas, se estudia su efecto antitumoral en tumores.

- Su forma activa parece tener un efecto negativo sobre el hueso.

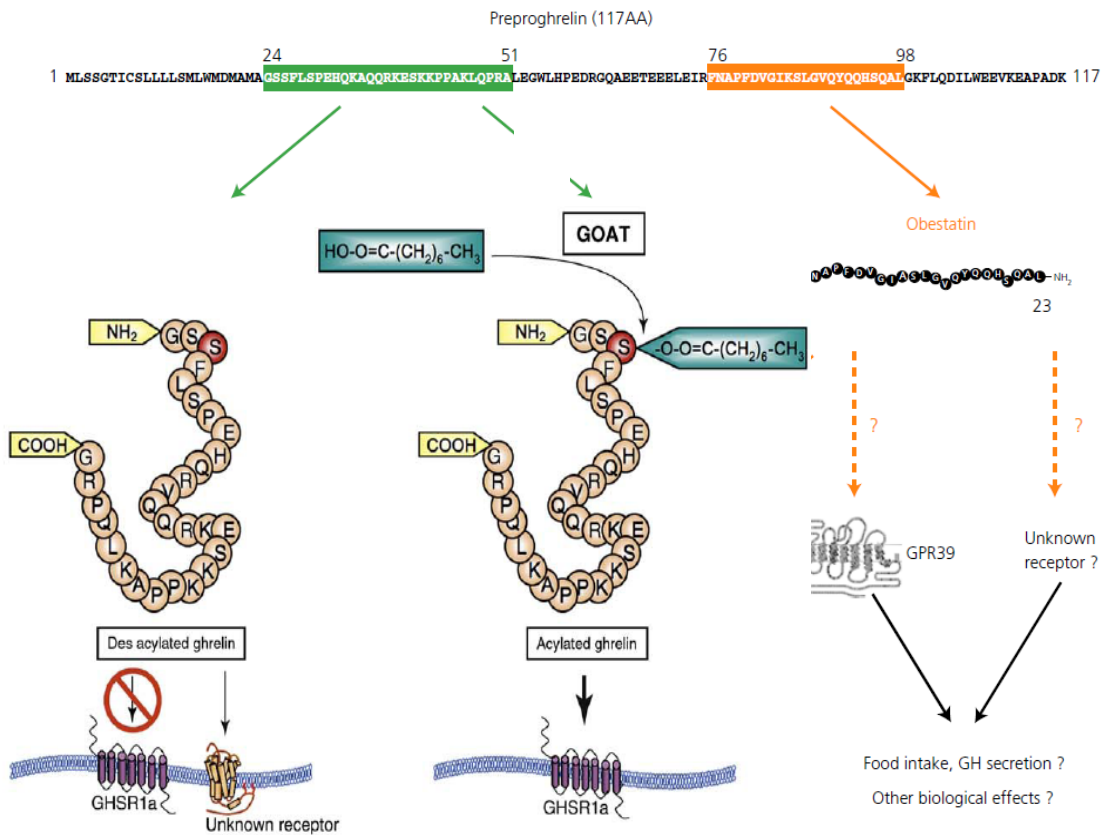
A pesar de estas múltiples funciones atribuidas a la ghrelina, y su conocido efecto orexigénico, resulta difícil establecer su papel en la regulación de la ingesta y del balance energético. Al menos en parte, dicha dificultad podría deberse a la complejidad de su regulación, que depende de múltiples factores, entre ellos: la regulación de su transcripción, su activación

mediante la acil-transferasa, el ratio de forma activa/forma no acilada, el proceso de desactivación, su unión a proteínas, la accesibilidad al tejido diana (y también el paso por la barrera hematoencefálica -BHE-), la expresión del receptor de la ghrelina en los tejidos diana, la sensibilidad a las señales intracelulares y la estabilidad plasmática del péptido (Hassouna et al 2010).

Desde su descubrimiento hasta ahora se han descrito múltiples productos del gen que da lugar a la ghrelina. Tras el procesado postranscripcional de la proghrelina y varias modificaciones, se genera desacil-ghrelina (a partir de los exones 1 y 2) y la c-ghrelina (a partir de los exones 3 y 4). La desacil-ghrelina es un péptido de 28 aa que tras la incorporación del grupo acil en el residuo 3 de la serina mediante la acción de una acil-transferasa, la ghrelin-O-acil-transferasa (GOAT), se convierte en la acil-ghrelina (Hassouna, Zizzari, & Tolle 2010; Andrews 2011). Por otro lado, la c-ghrelina contiene la obestatina, de 23 aa, formada a partir de los exones 3 y 4 de la preproghrelina (Chen et al 2009) (figura 5).

Durante el periodo de ayuno, se produce mayoritariamente y de forma creciente desacil-ghrelina, pero como GOAT está desactivada, la concentración circulante de acil-ghrelina permanece estable. Durante la ingesta y el periodo post-ingesta, aumentan los ácidos grasos de cadena media, lo que contribuye a la activación de la GOAT y al incremento de acil-ghrelina circulante (Romero et al 2010). Esto sugiere que GOAT puede tener un papel más importante en dicha activación del péptido que su propia síntesis. Esta modificación postranscripcional es necesaria para la unión a su receptor específico GHS-R1a (receptor unido a proteína G, cromosoma 3q26.2, 366 aa) que es el mediador de la mayor parte de efectos endocrinos, sobre el balance energético y la homeostasis de la glucosa. Aunque la forma activa es la forma acilada, la mayor parte de la ghrelina circulante es la no acilada (80-90%). Esta forma de desacil-ghrelina ha sido inicialmente descrita como una forma inactiva del péptido, y aunque existe controversia sobre su papel a nivel de acciones endocrinas y sobre el balance energético, sí parece tener un papel activo a nivel CV y antiproliferativo, y cuyas acciones podrían estar mediadas por receptores todavía no identificados.

Figura 5. Representación gráfica de la ghrelina y sus productos. Adaptada (Hassouna, Zizzari, & Tolle 2010; Andrews 2011).



El GHS-R1a tiene una distribución topográfica amplia, habiéndose detectado en múltiples tejidos, entre ellos el corazón, pulmón, hígado, riñón, páncreas, intestino, tejido adiposo, sistema inmunitario, glándula suprarrenal y médula espinal, pero sobre todo en el hipotálamo, la hipófisis anterior y otras áreas.

En la regulación de la ingesta y del balance energético participan múltiples factores y péptidos, tal y como hemos comentado previamente (veáse apartado de anorexia del envejecimiento). Entre ellos, la ghrelina juega un papel importante y regula el balance energético de dos maneras distintas (van der Lely et al 2004):

1. Como hormona periférica producida en el estómago, que del mismo modo que otras señales como insulina y leptina, informan a los centros hipotalámicos fundamentalmente de la disminución de la reserva energética, para aumentar los mecanismos orexigénicos y disminuir el gasto energético.
2. Como neuropéptido hipotalámico expresado en neuronas vecinas al tercer ventrículo, entre el hipotálamo ventromedial, el hipotálamo dorsal, el núcleo paraventricular y núcleo arcuato.

A diferencia de otros orexigénicos como el neuropéptido Y (NPY), AgRP (agouti related peptide), que sólo son activos cuando se inyectan a nivel cerebral, la administración periférica de la ghrelina tiene efectos orexigénicos y adipogénicos. Eso no significa que la acil-ghrelina pueda atravesar la BHE; la ghrelina desacilada podría tener también efecto hipotalámico porque hay áreas hipotalámicas cruciales para la homeostasis energética, como la parte ventromedial del núcleo arcuato, que no está totalmente protegida por la BHE. Estos núcleos hipotalámicos contienen GHS-R, y contienen neuronas orexigénicas que expresan NPY y AgRP y neuronas anorexigénicas que expresan proopiomelanocortina (POMC), α MSH (péptido producto de POMC) y CART (cocaine and amphetamine regulated transcript). La ghrelina induce la ingesta estimulando la actividad de las neuronas NPY y AgRP y el GHS-R1a se expresa en más del 90% de las neuronas NPY y en menos del 8% de las neuronas que expresan POMC.

A pesar de todo lo dicho, hay que tener en cuenta que la red de neuronas, neuropéptidos y receptores que controlan el balance energético es un sistema extremadamente complejo y multicéntrico. Otros agentes que podrían mediar en las señales de la ghrelina son POMC, cocaína, GABA (ácido gamma-aminobutírico) y galanina entre otros (van der Lely, Tschop, Heiman, & Ghigo 2004; Chen, Asakawa, Fujimiya, Lee, & Inui 2009).

5.1. PAPEL DE LA GHRELINA EN EL SÍNDROME METABÓLICO

La ghrelina parece jugar un papel en el metabolismo de la glucosa y lipídico, pero sus distintas isoformas acilada o desacilada presentan efectos opuestos. En el metabolismo de la glucosa, la acil-ghrelina interacciona en el páncreas con el GHS-R1a de la célula β de forma auto/paracrina, disminuye la liberación de insulina mediada por glucosa, disminuye la sensibilidad a la insulina y predispone a la hiperglicemia, y estimula la producción hepática de

glucosa; por contra, la desacil-ghrelina aumenta la sensibilidad a la insulina y mantiene la euglucemia y suprime la liberación de glucosa por los hepatocitos y antagoniza el efecto de la acil-ghrelina de la glucosa por una vía independiente del GHS-R1a, lo cual sugiere que la acil-ghrelina y la desacil-ghrelina son diferentes hormonas o como mínimo tienen efectos contrapuestos capaces de regular el metabolismo hepático de la glucosa por un vía directa sobre el hígado (Chen, Asakawa, Fujimiya, Lee, & Inui 2009). La coadministración endovenosa de acil-ghrelina y desacil-ghrelina provoca un descenso significativo de la concentración de insulina en los no diabéticos con obesidad mórbida (situación con resistencia a la insulina y niveles bajos de GH); dado que los niveles de glucosa no se modifican en las primeras 4 horas de infusión (Kiewiet et al 2009), ello sugiere una mejoría de la sensibilidad a la insulina. En humanos, sabemos que los picos de acil-ghrelina preceden a la ingesta y van asociados a niveles bajos de insulina, mientras que la ingesta va seguida de una disminución brusca de los niveles de ghrelina y un aumento de los niveles de insulina (Cummins et al 2001), lo que apoya una relación inversa entre la secreción de insulina y ghrelina en condiciones fisiológicas. Asimismo, la ghrelina juega un rol importante en el eje entero-insular mediante acciones adicionales, inhibiendo la secreción de adiponectina de los adipocitos y estimulando la liberación de otras hormonas contrarreguladoras como GH, cortisol, epinefrina, y posiblemente glucagón, PP y somatostatina (Chen, Asakawa, Fujimiya, Lee, & Inui 2009).

La ghrelina tiene un efecto lipogénico, tanto mediante acciones de regulación a nivel central como periférico. A nivel hipotalámico, la respuesta orexigénica fisiológica implica la inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos inducida por AMPK (AMP activated protein kinase), lo que resulta en la disminución de los niveles hipotalámicos de malonil-CoA y el aumento de la actividad CPT1 (carnitina palmitoil-transferasa 1). En este contexto, la activación hipotalámica de la oxidación de ácidos grasos inducida por la ghrelina, conduce a cambios en la cadena respiratoria mitocondrial hipotalámica y a la producción de ROS (reactive oxygen species). Esto es fundamental para la activación de las neuronas AgRP / NPY, la plasticidad sináptica de las neuronas POMC y la transcripción de genes dependientes de ghrelina. Sin embargo, el metabolismo de los ácidos grasos a nivel hipotalámico parece jugar un papel en la respuesta orexigénica sólo a corto plazo y parece que es independiente de la GH (Varela et al 2011).

Asimismo, los ácidos grasos libres tiene un efecto supresor sobre los niveles de ghrelina, generando un mecanismo de retroalimentación negativo (Chen, Asakawa, Fujimiya, Lee, & Inui

2009). Los efectos antilipolíticos de la ghrelina y sus derivados parece que se producen por un receptor independiente del GHS-R1a y estimulan la acumulación intracitoplasmática de lípidos. Un estudio reciente de Chen (Chen, Asakawa, Fujimiya, Lee, & Inui 2009) indica que tanto los cannabinoides como la acil-ghrelina estimulan la actividad de la AMPK en el hipotálamo y el corazón, mientras que la inhiben en el hígado y el tejido adiposo. Estos efectos de los cannabinoides y la acil-ghrelina sobre la AMPK estimulan la lipogénesis, a parte de su efecto directo sobre el apetito (Chen, Asakawa, Fujimiya, Lee, & Inui 2009). El efecto lipogénico central se produce fundamentalmente a través de las neuronas NPY / AgRP, por bloqueo de los receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3R y MC4R), mientras que la regulación periférica del metabolismo de los lípidos se produce a través del sistema nervioso simpático. Como resultado de estos eventos, a nivel del tejido adiposo blanco se incrementa la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de enzimas que promueven el depósito de grasas como la lipoproteína lipasa (LPL) y esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD1) (Varela, Vazquez, Cordido, Nogueiras, Vidal-Puig, Dieguez, & Lopez 2011).

La ghrelina por lo tanto, tendría como una de sus misiones fisiológicas el promover el incremento de la reserva energética para minimizar los efectos negativos de un periodo de ayuno o de insuficiente acceso a nutrientes. Durante la ingesta, los niveles altos de ghrelina favorecerían los procesos anabólicos, aumentando la lipogénesis e induciendo a UPC2 en el tejido adiposo blanco (Varela, Vazquez, Cordido, Nogueiras, Vidal-Puig, Dieguez, & Lopez 2011); una vez ejercido dicho efecto anabólico, en situación postprandial los niveles circulantes de ghrelina disminuyen.

Dado el papel de la ghrelina en la modulación del apetito, el gasto energético y la regulación del peso corporal y el aumento creciente de la obesidad en nuestra sociedad, resulta importante comprender el rol que pueda tener este sistema en su patogénesis. Además de inducir hiperfagia, la acil-ghrelina aumenta la masa grasa reduciendo su utilización. En humanos, los niveles de ghrelina total y desacil-ghrelina se han correlacionado negativamente con el IMC, pero positivamente con los de acil-ghrelina (Rodriguez et al 2009), sin embargo, otros estudios han mostrado una correlación negativa entre todos los productos del gen de la ghrelina con el IMC (Nakahara et al 2008). En sujetos obesos, a pesar de haberse descrito niveles más bajos de ghrelina que en los controles, habría una falta de supresión postprandial después de una dieta normal o alta en grasas, lo que sugiere que en las personas obesas este

mecanismo estaría alterado, predisponiendo a la hiperfagia y al exceso de aumento de peso (Yang et al 2009). Asimismo, las personas obesas también presentan un aumento patológico nocturno de la secreción de ghrelina (Yildiz et al 2004) y del ratio ghrelina/obestatina. Es por ello que se está investigando en el desarrollo de inhibidores de ghrelina para el tratamiento de la obesidad (Hassouna, Zizzari, & Tolle 2010; Andrews 2011).

Por otro lado, el síndrome de Prader-Willi es un síndrome hiperghrelinéxico, única condición con aumento de ghrelina que se correlaciona positivamente con obesidad extrema y que va asociado a una severa hiperfagia, déficit de GH, hipogonadismo, hipotonía neonatal, alteraciones morfológicas y deterioro cognitivo. Se ha postulado que el aumento de ghrelina condicionaría un apetito insaciable y facilitaría, al menos en parte, el desarrollo de obesidad en estos pacientes. En esta situación la acil-ghrelina se halla incrementada de forma marcada, mientras que la desacil-ghrelina no se modifica con respecto a obesos normales y la obestatina suele estar alta (Chen, Asakawa, Fujimiya, Lee, & Inui 2009).

Cada vez hay más evidencia científica que sugiere que la ghrelina está implicada en el desarrollo de DM y de SM –de forma causal o como consecuencia de dichas situaciones-, presentando niveles bajos en distintas condiciones patológicas como la obesidad, la obesidad central, la resistencia a insulina, la DM2 y la HTA (Ukkola 2011). En el estudio OPERA (Ukkola et al 2006) se vio que la concentración plasmática de ghrelina se correlacionaba negativamente con varios componentes del SM y el SM como tal, y que los niveles de ghrelina disminuían a medida que aumentaba el número de componentes del SM, por lo que se postuló que la ghrelina podría ser un marcador útil de SM. Datos similares se encontraron en el estudio de Envejecimiento de Mataró (Serra-Prat et al 2009a). El hecho que la asociación entre niveles de ghrelina y high-density lipoprotein (HDL) y glucosa permanezca significativa tras ajustar por IMC, sugiere que la asociación de ghrelina con el SM no depende totalmente de la masa grasa. Se ha sugerido que la resistencia a la insulina está relacionada con la ghrelina. Estudios del mismo grupo han demostrado una asociación independiente entre niveles bajos de ghrelina y concentración de insulina y resistencia a la misma (Poykko et al 2003b). Sin embargo, la combinación de concentraciones bajas de ghrelina y elevadas de leptina tendría un efecto sinérgico para aumentar la resistencia a insulina, las alteraciones metabólicas y favorecer el desarrollo de DM2 (Ukkola et al 2008). En el efecto diabetogénico de la ghrelina, la leptina parece ser un determinante mayor ya que la progresión a DM2 se produce mayormente en

situación de concentraciones elevadas de leptina. En relación a las dos isoformas de la ghrelina, datos recientes reportan que, a medida que aumenta el número de componentes del SM, se observa una disminución de los niveles circulantes de ghrelina total y desacil-ghrelina, mientras que los niveles de acil-ghrelina aumentan (Rodríguez et al 2010) o no cambian (St-Pierre et al 2007; Barazzoni et al 2007) en paralelo con la presencia de componentes del SM.

Por otra parte, la ghrelina disminuye de forma directa la liberación de insulina por los islotes pancreáticos. Recientemente, se ha demostrado este efecto en humanos, evidenciándose que la ghrelina suprime la secreción de insulina estimulada por glucosa y empeora la tolerancia a la glucosa en los individuos sanos (Tong et al 2010). Además la ghrelina está disminuida en los pacientes con DM2, de manera que se ha interpretado que la hiperinsulinemia compensadora inducida por la insulinresistencia provocaría la disminución de ghrelina; los niveles de ghrelina son menores en los pacientes con DM2 en comparación con los que no presentan DM2 pero sí presentan SM (Poykko, Kellokoski, Horkko, Kauma, Kesaniemi, & Ukkola 2003b). Todo ello indica una relación inversa entre ghrelina e insulina así como sensibilidad a la insulina. Si valoramos los distintos productos del gen de la ghrelina, la ghrelina total y la desacil-ghrelina se asocian negativamente a resistencia a insulina, mientras que la relación entre acil-ghrelina y HOMA es positiva (Barazzoni et al 2007). Asimismo, la ghrelina total y desacil-ghrelina son más bajas en obesos con SM que en no obesos con SM; sin embargo, la acil-ghrelina es similar y el ratio acil/desacil es mayor en los obesos que no obesos. Se ha descrito una alteración del balance de los distintos productos de la ghrelina en los obesos con SM, con un incremento relativo de las concentraciones de acil-ghrelina. Estas alteraciones parecen estar asociadas con el IMC y el perímetro de cintura, marcadores surrogados de aumento de grasa abdominal. El acúmulo de grasa abdominal puede estar por lo tanto, relacionado con el aumento de acilación de la ghrelina y la alteración en el balance de la ghrelina puede contribuir en la asociación entre insulinresistencia y aumento de IMC en el SM (Barazzoni, Zanetti, Ferreira, Vinci, Pirulli, Mucci, Dore, Fonda, Ciochi, Cattin, & Guarnieri 2007).

Sin embargo, hay datos contradictorios sobre la asociación de la ghrelina con el metabolismo de la glucosa, y en particular en relación a sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa hepática (Gauna et al 2005). Se ha especulado que los niveles bajos de ghrelina podrían afectar negativamente al eje GH/IGF-I, lo que aumentaría la resistencia a insulina y favorecería el desarrollo de DM2 (Poykko et al 2005). Adicionalmente, la administración conjunta de pulsos

de glucosa e insulina no inhibe la secreción de ghrelina, mientras que en un clamp euglicémico el aumento de la insulina se asocia a una disminución de la ghrelina (Pulkkinen et al 2010). Todo esto sugiere que la hiperinsulinemia acompañada de hiperglicemia, no afecta a los niveles de ghrelina (Ukkola 2011).

Por otra parte, se ha visto que los niveles de ghrelina son menores en caucásicos obesos que delgados (Poykko, Kellokoski, Horkko, Kauma, Kesaniemi, & Ukkola 2003b; Barazzoni, Zanetti, Ferreira, Vinci, Pirulli, Mucci, Dore, Fonda, Ciochi, Cattin, & Guarnieri 2007), que los niveles de ghrelina son menores en indios Pima delgados -más propensos a DM2 y resistencia a insulina- que en sujetos caucásicos (Tschop et al 2001), y también se ha evidenciado que entre los individuos obesos, los niveles de ghrelina son menores en los insulín-resistentes que en los insulín-sensibles (St-Pierre et al 2007). Adicionalmente, también se ha demostrado que la pérdida de peso aumenta la ghrelina en los obesos, pero en la fase de mantenimiento, la ghrelina vuelve a reducirse a los niveles previos a los de la pérdida ponderal (García et al 2006).

Finalmente, la ghrelina podría tener un papel en la aterosclerosis precoz, en asociación con la leptina y la IGF-I (Ukkola, Poykko, Paivansalo, & Kesaniemi 2008). En el estudio OPERA se vio que las concentraciones bajas de ghrelina se asociaban con SM y DM2 en el cuartil alto de leptina, pero no en el cuartil bajo de leptina, que la relación ghrelina/leptina se asocia independientemente con el grosor de íntima media (GIM) de carótida y que la asociación positiva entre ghrelina y GIM de carótida se ve en los niveles más bajos de IGF-I.

La importancia que pueda tener la ghrelina en el desarrollo del SM o la influencia sobre los componentes individuales del mismo es hoy en día relativamente desconocido en sujetos ancianos y presenta algunos datos contradictorios en los escasos estudios realizados; así, mientras en mujeres de menos de 30 años la ghrelina parece relacionarse con diversos componentes del SM, ello no así en mujeres de 30 a 50, donde por ejemplo no existe relación con obesidad (Schutte et al 2007). En cambio, en el estudio de Rancho Bernardo la mayor parte de interacciones de ghrelina con los distintos componentes del SM se vieron influidos de forma determinante por el IMC; la ghrelina mostró así mismo relación con factores culturales y de estilo de vida (Langenberg et al 2005).

5.2.PAPEL DE LA GHRELINA EN LA COGNICIÓN

Además del hipotálamo y la hipófisis, se ha visto que el receptor GHS-R1a también se expresa abundantemente en neuronas extrahipotálamicas, lo que explicaría el postulado papel de la ghrelina en la promoción del aprendizaje y la memoria a través de la plasticidad del hipocampo. Se ha propuesto que la ghrelina evita la neurodegeneración de la sustancia nigra, del hipocampo y del córtex e influye en el núcleo dorsal de rafe y el sistema límbico regulando el estado de ánimo, la ansiedad y la depresión (Andrews 2011). Por todos estos motivos, también se ha relacionado a la ghrelina con la EA (Gahete et al 2010).

Estudios iniciales sugerían que la presencia de ghrelina en distintos tejidos era escasa, pero actualmente se sabe que es especialmente abundante en el hipotálamo (en el núcleo arcuato, especialmente en la parte ventral regulando el apetito, y en las neuronas hipotalámicas adyacentes al tercer ventrículo entre los núcleos dorsal, ventral y paraventricular) y en el córtex cerebral (área somomotora y gyrus cingular). El receptor de la ghrelina se encuentra en el núcleo arcuato, el núcleo ventromedial y regiones CA2, CA3 y gyrus dentato del hipocampo, en la pars compacta de la sustancia nigra, el área tegmental ventral y núcleos del rafe ventral y medial y el núcleo Edinger-Westphal, sin embargo no se encuentra en el córtex ni el cerebelo (Gahete, Rubio, Duran-Prado, Avila, Luque, & Castano 2010).

Se ha demostrado que la inyección intracerebroventricular de ghrelina aumenta la memoria de retención en ratas (Carlini et al 2002) y que la inyección intrahipocampal mejora la retención de información cuando se administra antes del entrenamiento, pero no cuando se administra después (Carlini et al 2010). El aprendizaje mediado por ghrelina requeriría de la serotonina procedente del núcleo del rafe, ya que el pretratamiento con inhibidores serotoninérgicos, como la fluoxetina, previene la retención inducida por ghrelina en el hipocampo (Carlini et al 2007). La ghrelina puede cruzar la BHE, se acumula en el hipocampo y favorece la plasticidad aumentando el número de conexiones sinápticas; este aumento en la plasticidad se ha demostrado que lleva a una mejoría en el aprendizaje y la memoria. Asimismo, la ghrelina actúa en el hipocampo favoreciendo la neurogénesis, aunque todavía no se sabe si este efecto es funcionalmente importante en el aprendizaje y memoria. Éste sería un mecanismo directo por el cual la ghrelina favorecería el aprendizaje y la memoria, pero habría también un

mecanismo indirecto mediado por el efecto estimulador de la ghrelina sobre la GH, que aumentaría la IGF-I, la cual también favorecería la neurogénesis (Andrews 2011).

Por otro lado, la ghrelina activa el sistema mesolímbico dopaminérgico formado por las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral que se proyectan al núcleo accumbens, la amígdala, el hipocampo y el córtex medial prefrontal, el cual regula la recompensa, el refuerzo y la motivación. El mecanismo por el cual la ghrelina regula esta vía se desconoce, podría ser mediante el GHS-R1a y alguno de los receptores dopaminérgicos (Andrews 2011). Asimismo, la ghrelina también controla la ansiedad por vía serotoninérgica. La administración de ghrelina intracerebroventricular aumenta la ansiedad en ratas. Este efecto podría estar mediado también por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenalina y por la hormona liberadora de la corticotropina (CRH - corticotropin releasing hormone-) en los núcleos paraventriculares. Sin embargo, algunos estudios han visto un efecto ansiolítico de la ghrelina, pero estos datos contradictorios se podrían deber al tiempo de administración de la ghrelina (efecto ansiogénico a los 10 min de inyección, mientras que el efecto ansiolítico se ve a 45 minutos, considerando que la vida media de la ghrelina es de 30 minutos) (Carlini, Monzon, Varas, Cragolini, Schioth, Scimonelli, & de, Sr. 2002; Kanehisa et al 2006).

Los efectos neuroprotectores de la ghrelina se han visto en modelos animales de patologías neurológicas, como la enfermedad de Parkinson, el ictus y la epilepsia. En la enfermedad de Parkinson se ha visto que la inyección de ghrelina disminuye la pérdida de neuronas dopaminérgicas e inhibe la activación de la microglía, mecanismos implicados en la patogénesis de ésta. Parece que este efecto neuroprotector está mediado por la activación de la UCP-2 dependiente de las mitocondrias (Andrews 2011). También hay estudios recientes que demuestran el efecto neuroprotector en los modelos de ictus, tanto in vivo como in vitro. Tanto la acil-ghrelina como la desacil-ghrelina son igual de eficaces reduciendo el volumen del infarto. Los mecanismos incluyen la disminución de la apoptosis y el aumento de la función mitocondrial. Activan la cascada de señalización intracelular (erk1/2, Akt1/2, PI3k y PKC), que conduce a la inhibición de la apoptosis vía Bcl2, evitando la liberación de citoquinas e inhibiendo la activación de caspasa 3. Ambas también inhiben la activación de eventos proapoptóticos, como p38 y JNK. El mecanismo protector también podría estar mediado por el efecto de ghrelina sobre GH e IGF-I (Andrews 2011).

La EA también ha sido estudiada en relación a la ghrelina. Recientemente, se ha utilizado el modelo animal con ratas para estudiar con más detalle el papel que tiene la ghrelina en esta enfermedad. Este modelo se generó a partir de la inyección intrahipocampal de formas oligoméricas del péptido A β (A β O), que se ha relacionado directamente con el daño neuronal en la EA (Moon et al 2011). Los resultados mostraron que la inyección sistémica de ghrelina revertía los déficits de memoria que presentaban tras la inyección intrahipocampal de A β O. Además, también mejoraba las anomalías neuropatológicas e inhibía la reactivación de la microgliosis por A β O, previniendo la respuesta inflamatoria, evitaba la pérdida neuronal en el gyrus dentatus y aumentaba la densidad de sinapsis y de fibras nerviosas colinérgicas a nivel hipocampal. Con todo ello, se podría decir que la inyección sistémica de ghrelina prevendría los déficits cognitivos inducidos por A β O, posiblemente por inhibición tanto de la microgliosis como de la pérdida de integridad neuronal (Moon, Choi, Nam, Hong, Choi, Oh, & Mook-Jung 2011). También se ha visto en modelos animales knockout para ghrelina que tienen un menor número de sinapsis y realizan peor los test de reconocimiento de objetos, mientras que la administración de ghrelina restaura rápidamente estos déficits (Diano et al 2006).

A pesar de la creciente evidencia que existe de la relación entre el sistema de la ghrelina y el metabolismo, la inflamación, la neuroprotección y la memoria y los procesos de aprendizaje, pocos estudios han demostrado la implicación del sistema de ghrelina y la EA en humanos. En 2002, un primer estudio demostró que los niveles de ghrelina plasmática en sujetos ancianos con normopeso, eran significativamente más bajos que en los individuos jóvenes también con peso normal, demostrando por primera vez que hay una disminución de los niveles de ghrelina con la edad (Rigamonti et al 2002). Nuestro grupo también demostró posteriormente esta disminución de los niveles de ghrelina con la edad en los sujetos del estudio de Envejecimiento de Mataró (Serra-Prat, Fernandez, Burdoy, Mussoll, Casamitjana, & Puig-Domingo 2007), y no sólo eso, sino que también hay una alteración del patrón de secreción de ghrelina tras la ingesta, donde el anciano no frágil pierde la capacidad de recuperación de los niveles circulantes tras las 4 horas de la ingesta, y en el anciano frágil los niveles son más bajos inicialmente sin capacidad de recuperación posterior (Serra-Prat, Palomera, Clave, & Puig-Domingo 2009b).

Una hipótesis sugerida es que la ghrelina podría ser importante especialmente en la regulación de las funciones cerebrales dependientes del estado metabólico, más que del metabolismo

energético per se. Esto no sería sorprendente si se tiene en cuenta que la mayoría de tests cognitivos en roedores se llevan a cabo tras un periodo de privación de ingesta o en ayuno, estados paralelamente asociados a niveles altos de ghrelina (Diano, Farr, Benoit, McNay, da, I, Horvath, Gaskin, Nonaka, Jaeger, Banks, Morley, Pinto, Sherwin, Xu, Yamada, Sleeman, Tschop, & Horvath 2006). La idea que el aprendizaje espacial y la atención están más desarrollados durante el ayuno va en la misma línea con la necesidad del animal en situación de experimentación cognitiva, que está en una situación de balance energético negativo, de identificar y localizar fuentes de energía para sobrevivir.

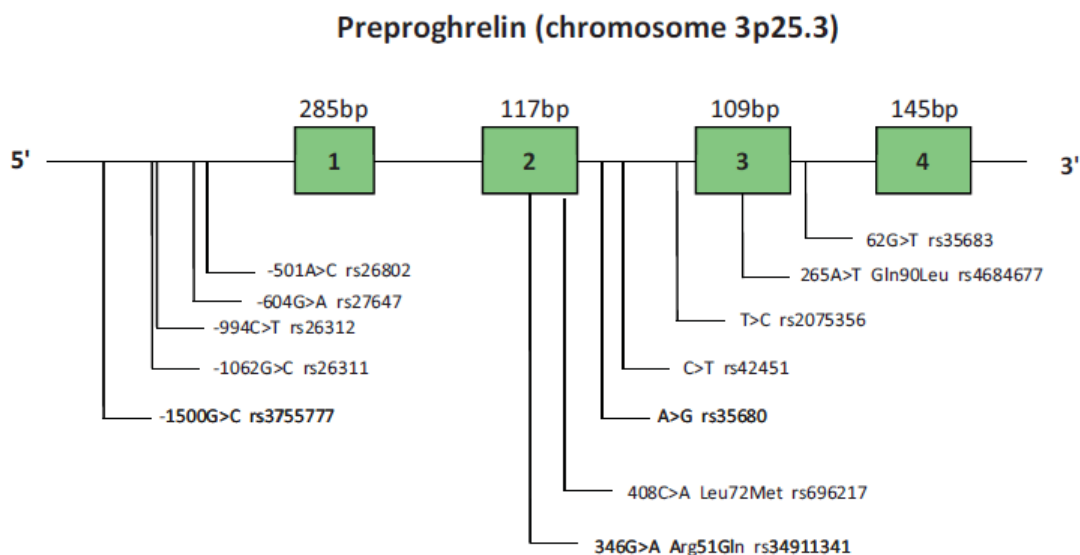
No fue hasta 2010 en que se exploró la expresión de ghrelina en el cerebro humano y sus efectos en la EA por Gahete et al (Gahete, Rubio, Duran-Prado, Avila, Luque, & Castano 2010). En este estudio, se analizaba los niveles de ARNm de ghrelina en tres regiones diferentes del gyrus temporal (inferior, medial y superior) en cerebros de controles e individuos con EA, ya que se considera que el lóbulo temporal es una de las estructuras corticales asociadas a la memoria y la cognición, y una de las más afectadas en la EA. Se vio que en estas regiones había una menor producción local de ghrelina comparado con los controles por edad. Además, en este estudio se describió una nueva variante de ghrelina, In2-ghrelina, que también puede ser acetilada por la GOAT, y que también se expresa en el lóbulo temporal y está infraexpresada en la EA. GOAT está expresada igualmente en el lóbulo temporal y alterada en la EA, lo que sugiere que habría una secreción auto/paracrina en el lóbulo temporal y que alteraciones en la producción de acil y desacil-ghrelina y de In2-ghrelina podrían tener un papel relevante en la cognición y en la EA (Gahete, Rubio, Duran-Prado, Avila, Luque, & Castano 2010). El ratio GHS-R1a/GHS-R1b está totalmente alterado en la EA. Esta situación podría contribuir a la señalización defectuosa ghrelina/ GHS-R1a. Por lo tanto, la reducción de la expresión de ghrelina y GOAT, junto con la alteración del ratio GHS-R1a/GHS-R1b podrían modificar patológicamente la señalización auto/paracrina de la ghrelina en el lóbulo temporal de los sujetos con EA, contribuyendo a la pérdida de memoria y de aprendizaje observado en estos pacientes (Gahete et al 2011).

5.3.POLIMORFISMOS DE LA GHRELINA Y SUS IMPLICACIONES

Los polimorfismos de la ghrelina más estudiados hasta la fecha son los situados en las regiones promotora y codificante del gen y alguno de ellos está relacionado con la actividad del mismo

(Garcia et al 2009). Hasta el momento se ha descrito un número considerable de polimorfismos para el gen de Ghrelina (figura 6 (Liu, Garcia, & Korbonits 2011)), pero los más estudiados son 6 (-994CTrs26312, -604GA rs27647, -501AC rs26802, Arg51Gln, Leu72Met y Gln90Leu). Los más conocidos son Arg51Gln, que se encuentra en la zona que regula la generación de la hormona madura activa, y Leu72Met y Gln90Leu, localizados en otras zonas del gen (Steinle et al 2005). Leu72Met (C247A) se encuentra en la región del gen situado entre las regiones codificantes para ghrelina madura y obestatina. Las consecuencias funcionales de esta variante se desconocen, ya que aunque no cambie la secuencia de la ghrelina madura, alteraciones en la estabilidad del ARNm o cambios en el procesado de la proteína podrían modificar la secreción de la ghrelina y/o su actividad (Zavarella et al 2008). El SNP (single nucleotide polymorphism) para Gln90Leu (A265T) causa un cambio en un aminoácido del péptido de la obestatina y las posibles consecuencias de este cambio también se desconocen (Zhang, Ren, vsian-Kretchmer, Luo, Rauch, Klein, & Hsueh 2005).

Figura 6. Gen de la preproghrelina y sus polimorfismos con sus localizaciones en el gen (Liu, Garcia, & Korbonits 2011).



Estos polimorfismos se han estudiado previamente en diversas poblaciones en relación al desarrollo de sobrepeso, obesidad, hipertensión y SM con resultados variables, algunos mostrando asociación (Steinle, Pollin, O'Connell, Mitchell, & Shuldiner 2005; Li et al 2008; Xu et

al 2008) mientras otros no (Bing et al 2005). Se ha descrito una asociación entre Leu72Met y SM (Steinle, Pollin, O'Connell, Mitchell, & Shuldiner 2005; Xu, Xiang, Qiu, & Xu 2008), así como con la glucosa en ayunas, niveles bajos de HDL y altos de triglicéridos (Steinle, Pollin, O'Connell, Mitchell, & Shuldiner 2005). Además, se ha descrito también que la prevalencia de SM es menor en los homocigotos (Steinle, Pollin, O'Connell, Mitchell, & Shuldiner 2005). En la tabla 1 se indican las principales asociaciones de estos polimorfismos con el SM y la DM2 (Pulkkinen, Ukkola, Kolehmainen, & Uusitupa 2010).

A pesar de los numerosos datos sobre la asociación entre los polimorfismos de la ghrelina y el SM, no existen prácticamente información respecto a su asociación en relación al estado cognitivo. Un estudio ha mostrado sin embargo, la asociación entre Gln90Leu y la EA (Shibata et al 2011).

Tabla 1. Principales asociaciones descritas entre los polimorfismos de la ghrelina y parámetros metabólicos (Pulkkinen, Ukkola, Kolehmainen, & Uusitupa 2010). Adaptada.

	SNP	Alelo riesgo	Asociación	Sujetos	Referencia
Obesidad	Leu72Met	Met72	< edad aparición obesidad	Mujeres suecas: 96 obesas/96 normopeso	(Ukkola et al 2001)
	Leu72Met	Met72	> IMC, masa grasa y visceral	Estudios Quebec + HERITAGE (784 +778 sujetos blancos + afroamericanos)	(Ukkola et al 2002)
	Leu72Met	Met72	> IMC y < edad inicio obesidad	70 niños altos y obesos	(Korbonits et al 2002)
	Leu72Met	Met72	< edad inicio obesidad	Italia, niños: 81 obesos/sobrepeso +96 normopeso. Adultos: 72 normopeso	(Vivenza et al 2004)
	Leu72Met	Met72	< edad inicio obesidad	Italia: 300 niños obesos + 200 controles	(Miraglia del et al 2004)
	Leu72Met		No asociación	222 niños coreanos obesos	(Jo et al 2005)
	Leu72Met		No asociación	771 obesos caucásicos	(Sorensen et al 2006)
	Leu72Met	Met72	> IMC y perímetro cintura	2238 japoneses	(Kuzuya et al 2006)
	Leu72Met	Met72	<IMC en pacientes con ECV	317 chinos con ECV + 323 controles	(Tang et al 2008a)
	Leu72Met		No asociación	China: 271 SOPQ + 296 controles	(Wang et al 2009)
	Leu72Met		No asociación	China/niños: 230 obesos + 100 controles	(Zhu et al 2010)
	-501A>C		> IMC	Estudio OPERA: 1045 finlandeses	(Vartiainen et al 2006)
	-501A>C		No asociación	Población centro Europa	(Hubacek et al 2008)
	Gln90Leu	Leu90	>obesidad extrema en niños y adolescentes	Alemania/ñinos: 215 obesos extremos +93 normopeso	(Hinney et al 2002)
Diabetes	Leu72Met	Met72	<secreción insulina y > sensibilidad a insulina	70 niños altos y obesos	(Korbonits, Gueorguiev, O'Grady, Lecoœur, Swan, Mein, Weill, Grossman, & Froguel 2002)
	Arg51Gln	Gln51	>riesgo DM2	Finlandia Estudio OPERA: 519 HTA +526 normotensos	(Poykko et al 2003a)
	Leu72Met		No asociación	Finlandia: 258 DM2 + 522 controles	(Ukkola & Kesaniemi 2003)

Leu72Met	Met72	>glucosa basal	856 Amish de EEUU	(Steinle, Pollin, O'Connell, Mitchell, & Shuldiner 2005)
Leu72Met		No asociación	Corea: 760 DM2+641 noDM	(Choi et al 2006)
Leu72Met	Leu72	>insulina basal y HOMA	1420 Caucásicos: 500 normopeso + 920 sobrepeso/obesidad	(Zavarella, Petrone, Zampetti, Gueorguiev, Spoletini, Mein, Leto, Korbonits, & Buzzetti 2008)
-604 >C/T	C			
Leu72Met	Met72	< frecuencia de nefropatía diabética con IR	138 sujetos con ND + 69 DM sin ND	(Lee et al 2006)
Leu72Met	Met72	< riesgo DM2	Finnish diabetes prevention study: 507 con IGT	(Mager et al 2006b)
Leu72Met		No asociación	Corea: 760 DM2 + 641 no DM	(Choi, Cho, Moon, Choi, Shin, Jang, Kim, Lee, & Park 2006)
Leu72Met	Met72	< riesgo DM2	Caucásicos: 420 DM2 + 430 controles	(Berthold et al 2009)
Leu72Met		No asociación	China: 877 DM2+864 controles	(Liu et al 2012)
Leu72Met	Met72	< riesgo DM2	Metaanálisis: 3417 casos + 3081 controles	(Liao et al 2013)
Leu72Met		No asociación con SM	Dinamarca: DanMONICA cohort 2413 sujetos	(Bing, Ambye, Fenger, Jorgensen, Borch-Johnsen, Madsbad, & Urhammer 2005)
Leu72Met	Met72	>SM, glucosa basal, TG y <HDL	856 Amish de EEUU	(Steinle, Pollin, O'Connell, Mitchell, & Shuldiner 2005)
Arg51Gln	Gln51	<SM		
Leu72Met	Met72	>SM	China: 240 SM + 427 controles	(Xu, Xiang, Qiu, & Xu 2008)
Leu72Met		No asociación con SM	China/niños: 230 obesos + 100 normopeso	(Zhu, Liang, Zou, & Fu 2010)
Leu72Met	Met72	>TG y <HDL	856 Amish de EEUU	(Steinle, Pollin, O'Connell, Mitchell, & Shuldiner 2005)
Arg51Gln		No asociación	R Checa: 1191 varones + 1368 mujeres representativas de la población	(Hubacek et al 2007)
Leu72Met	Met72	<HDL		
Gln90Leu		No asociación		
-501A>C		No asociación con perfil lipídico	Canada: 1464 sujetos	(Martin et al 2008)
Arg51Gln	Gln51	>riesgo HTA	Finlandia Estudio OPERA: 519 HTA +526 normotensos	(Poykko, Ukkola, Kauma, Savolainen, & Kesaniemi 2003a)

	Leu72Met	Leu72	<TAS y TAD al inicio y a los 3 años de seguimiento	Finnish diabetes prevention study: 507 con IGT	(Mager et al 2006a)
	Gln90Leu	Gln90			
	-501A/C	A			
	-604G/A	G			
	-501A/C	C			
			>HTA	Caucásicos: 1143 HTA + 1489 controles	(Berthold et al 2010)

<: Menor, > mayor, IMC: índice masa corporal; ECV: enfermedad cardiovascular; DM2: diabetes mellitus 2; IR: insuficiencia renal; IGT: intolerancia a la glucosa; SM: síndrome metabólico; SOPQ: síndrome de ovario poliquístico; TG: triglicéridos; HDL: high-density lipoprotein; HTA: hipertensión arterial; TAS: tensión arterial sistólica, TAD: tensión arterial diastólica.

6.OBESTATINA

La obestatina fue descubierta por Jian Zhang en 2005 (Zhang, Ren, vsian-Kretchmer, Luo, Rauch, Klein, & Hsueh 2005) como una hormona contrapuesta a la ghrelina que se encuentra en el estómago y en menor proporción en el intestino delgado (duodeno y yeyuno), colon, bazo, córtex cerebral, hipófisis e hipotálamo, páncreas, plexo mientérico y en las células de Leydig de testes de ratas (Tang et al 2008b). Inicialmente se postuló que la obestatina se unía al GPR39 (receptor asociado a prot G) (Zhang, Ren, vsian-Kretchmer, Luo, Rauch, Klein, & Hsueh 2005), pero no se ha podido confirmar en estudios posteriores (Chartrel et al 2007) y bastantes datos sugieren que no es así, por lo que el receptor nativo de la obestatina todavía está por identificar (Tang, Jiang, Zhang, Zhu, Shu, Gao, Feng, Wang, & Dong 2008b). Parece tener papel en la proliferación, supervivencia y antiapoptosis, y está relacionada con la ingesta, el peso, la composición corporal y el gasto energético. Su efecto muestra una relación dosis dependiente con patrón “U-shaped”, donde dosis baja y alta no tendrían efectos detectables.

En situación de ayuno, las concentraciones circulantes de ghrelina son altas y las de obestatina bajas, lo que sugiere que ambas hormonas están inversamente reguladas. La administración intraperitoneal e intracerebroventricular de obestatina suprime la ingesta de forma dosis dependiente, inhibe el vaciado gástrico, disminuye la contractilidad del yeyuno y antagoniza el efecto de la ghrelina. Sin embargo, la administración de obestatina no tendría un papel directo sobre la ingesta, e inhibiría el efecto orexigénico de la ghrelina y se comportaría como una hormona anorexigénica indirecta (Zhang, Ren, vsian-Kretchmer, Luo, Rauch, Klein, & Hsueh 2005). Los ratones con delección del gen de ghrelina no tienen alteración del crecimiento ni del apetito, probablemente porque han perdido tanto el efecto orexígeno de la ghrelina como el anorexígeno de la obestatina (Wortley et al 2004). Sin embargo, en ratones transgénicos con hipoexpresión de desacil-ghrelina, se produce pérdida de peso, habiéndose sugerido que estaría mediado por obestatina, que en ese caso estaría actuando de forma directa (Ariyasu et al 2005).

Posteriormente, Nogueiras et al (Nogueiras, Pfluger, Tovar, Arnold, Mitchell, Morris, Perez-Tilve, Vazquez, Wiedmer, Castaneda, DiMarchi, Tschop, Schurmann, Joost, Williams, Langhans, & Dieguez 2007) intentaron reproducir los estudios de Zhang sin éxito, y no observaron efecto de obestatina en la ingesta, el peso, la composición corporal, el gasto energético, la actividad locomotora ni el balance energético regulado por el hipotálamo. Las ratas a las que se inyectó obestatina tenían niveles similares a los controles en ingesta y peso y composición corporal. Una explicación para la discrepancia entre los resultados de Zhang (Zhang, Ren, vsian-Kretchmer, Luo, Rauch, Klein, & Hsueh 2005) y Nogueiras (Nogueiras, Pfluger, Tovar, Arnold, Mitchell, Morris, Perez-Tilve, Vazquez, Wiedmer, Castaneda, DiMarchi, Tschop, Schurmann, Joost, Williams, Langhans, & Dieguez 2007) es que se hicieran las mediciones en condiciones técnicamente diferentes. Adicionalmente, estas diferencias en los resultados también podrían deberse a que se midan diferentes fragmentos de la obestatina. En un estudio de Nagaraj et al (Nagaraj et al 2008) se vio que los fragmentos N-terminal, central o C-terminal mostraban diferentes grados de reducción de la ingesta y ganancia de peso, donde el fragmento N-terminal era tan efectivo en disminuir la ingesta y aumentar de peso como la obestatina completa, mientras que los otros dos fragmentos tenían un efecto escaso o nulo.

En un estudio de Zizzari et al (Zizzari et al 2007) se vio que la administración de obestatina (1 mcmol/kg peso) fue inefectiva en la ingesta. En los animales en situación postprandial, la administración de ghrelina aumenta la ingesta en ratones, y sólo la coadministración de obestatina inhibe este efecto, pero no en animales en situación de ayuno, con elevadas concentraciones de ghrelina. Ello puede deberse a que superado un cierta concentración circulante de ghrelina en ayunas considerada como el umbral superior de activación, la administración de ghrelina exógena ya no puede estimular más la ingesta. Esto demuestra que la obestatina exógena per se, no induce cambios en la ingesta en ratones en ayunas, sin embargo, inhibe el efecto orexigénico de la ghrelina en los ratones que no están en ayunas.

En relación a otros efectos de la obestatina, la administración intravenosa o intracerebroventricular de ésta en ratas anestesiadas, no modifica la GH, PRL, ACTH ni TSH, pero sí disminuye la vasopresina cuando se administra a nivel intracerebroventricular. Se ha visto que inhibe la ingesta de agua. Parece que también aumenta el nivel de memoria al igual que la ghrelina, tiene un efecto ansiolítico, al contrario que la ghrelina, tiene un efecto opuesto

sobre el sueño e inhibe la secreción de IGF-I (Tang, Jiang, Zhang, Zhu, Shu, Gao, Feng, Wang, & Dong 2008b).

6.1. PAPEL DE LA OBESTATINA EN EL SÍNDROME METABÓLICO

El papel de la obestatina en la obesidad, la DM2 y el SM son muy controvertidos, de manera similar a lo que sucede con la ghrelina. Estudios en humanos han demostrado que los niveles de obestatina no cambian significativamente con la ingesta, pero son menores en obesos que en delgados, lo que sugiere un cierto papel de la obestatina en la regulación del peso (Huda et al 2008) o viceversa, que los valores ponderales y la adiposidad influyen en la obestatina. Guo et al mostraron que los niveles preprandiales del ratio ghrelina/obestatina eran mayores en obesos y se correlacionaban positivamente con el IMC (Guo et al 2007). Sin embargo, Vicennati et al demostraron que en presencia de obesidad, las mujeres tenían mayores niveles de obestatina, menores de ghrelina y, por lo tanto, menor ratio ghrelina/obestatina (Vicennati et al 2007). Asimismo, las diferencias entre estos estudios podrían deberse a diferentes estados de obesidad, sin embargo, estos estudios sugieren que hay una disregulación de los niveles de ghrelina y obestatina y que cambios en los niveles circulantes de ghrelina y obestatina representan cambios adaptativos del desarrollo de obesidad más que defectos primarios, y que su alteración en los niveles circulantes reflejan un desbalance de los mecanismos reguladores o los mecanismos responsables de los procesos metabólicos (Ren et al 2009a).

Por otra parte, la inyección intraperitoneal de obestatina reduce la glucemia y la respuesta a la insulina en ratones que han comido, asociado a una reducción de la ingesta, pero sin observarse estos datos en los animales en ayunas (Green et al 2007). Unniappan et al observaron que no había cambios en la obestatina tras la inyección de glucosa en ratones en ayunas (Unniappan et al 2008). Sin embargo, Ren et al mostraron que la inyección endovenosa de obestatina reducía la respuesta a la insulina del bolo endovenoso de glucosa (Ren, Guo, Wang, Lin, Zheng, & Yuan 2009a). Estas discrepancias se podrían explicar por la utilización de especies diferentes, métodos diversos de administración o diferentes dosis de obestatina y glucosa, así como diferentes fuentes de obestatina. El efecto de la obestatina en la liberación de insulina in vitro es controvertido. Varios estudios han encontrado que ratas incubadas en presencia de concentraciones constantes de glucosa, la obestatina inhibía la secreción de insulina (Qader et al 2008; Ren, Guo, Wang, Lin, Zheng, & Yuan 2009a). Sin embargo, estos

autores no encontraron dicho efecto a concentraciones normales o bajas de glucosa. Por el contrario, Granata et al encontraron que a bajas concentraciones, la obestatina potencia la secreción de insulina inducida por glucosa en islotes de humanos (Granata et al 2008). Parece que la concentración de glucosa podría ser crítica para explicar el efecto de la obestatina en la secreción de insulina (Unniappan, Speck, & Kieffer 2008;Egido et al 2009).

En cuanto a su relación con diabetes, se ha visto que niveles bajos de obestatina se asocian a un aumento de la resistencia a la insulina (Qi et al 2007). También Anderwald-Stadler et al han reportado que los niveles de obestatina en ayunas, pero no los de ghrelina, están disminuidos en situación de resistencia a la insulina y se asocian positivamente a sensibilidad a la insulina en sujetos no diabéticos, además de que los niveles de obestatina están disminuidos por la insulina, en los insulín-sensibles pero no en los insulín-resistentes (Anderwald-Stadler et al 2007). Todo esto sugiere que la insulina y la sensibilidad a la insulina pueden estar influidos por la obestatina, pero los mecanismos responsables todavía no se conocen (Ren, Guo, Wang, Lin, Zheng, & Yuan 2009a).

Hay pocos estudios que hayan valorado la asociación entre obestatina y aterosclerosis. Kelloskoski et al demostraron en estudios in vitro que la obestatina disminuye la expresión en las células endoteliales de la vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) y aumenta la low-density lipoprotein (LDL) oxidado que se une a los macrófagos (Kelloskoski et al 2009). También parece jugar un papel en la regulación de la tensión arterial, con una correlación positiva (Ren et al 2009b).

6.2.PAPEL DE LA OBESTATINA EN LA COGNICIÓN

Ya se ha referido previamente el papel de la ghrelina en la memoria y el aprendizaje. La obestatina parece tener efectos opuestos a la ghrelina en cuanto a la homeostasis energética y la función gastrointestinal. Sin embargo, aunque existen pocos datos en referencia a la cognición y la obestatina, todos parecen sugerir que la obestatina también tiene un efecto neuroprotector, al igual que la ghrelina. Como ya se ha indicado previamente, inicialmente se sugirió que la obestatina se unía al GPR39, lo cual era muy sugerente ya que hay niveles altos de GPR39 en la amígdala, el hipocampo, el córtex auditivo, sin expresión en el hipotálamo

(Jackson et al 2006), pero ya se ha comentado también las dudas que existen actualmente de la relación entre obestatina y GPR39.

En los estudios de Carlini et al (Carlini, Schioth, & Debarioglio 2007) se ha visto que la obestatina tiene un efecto ansiolítico en modelo murino y que incrementa su capacidad de aprendizaje. Parece pues que obestatina tiene efectos opuestos respecto a ghrelina en su efecto ansiolítico e inhibidor del apetito, pero al igual que ghrelina, positivo en relación a la memoria.

6.3.PAPEL DE LA OBESTATINA EN LA CAPACIDAD FUNCIONAL

Como ya se ha comentado en apartados previos, la pérdida de musculatura asociada a la edad es un proceso multifactorial asociado a la actividad física, la alimentación, el estrés oxidativo y los cambios hormonales. Se desconoce en buena medida, cuál es el papel que puedan tener la ghrelina y la obestatina.

La GH y la IGF-I disminuyen en el envejecimiento y esto está probablemente relacionado con los cambios metabólicos, de composición corporal y de capacidad funcional que se observan en los ancianos (Ceda et al 2005;Puig-Domingo, Serra-Prat, Merino, Pubill, Burdoy, & Papiol 2008). Además, también se ha observado una disminución de los niveles de ghrelina con la edad (Serra-Prat, Fernandez, Burdoy, Mussoll, Casamitjana, & Puig-Domingo 2007), lo que, como ya hemos comentado, podría contribuir también al fenómeno de la “anorexia del envejecimiento” e influir en las alteraciones nutricionales características de un subgrupo considerable de personas ancianas. Nuestro grupo ha descrito una asociación entre ghrelina y su disminución con la edad, la fuerza muscular y la capacidad funcional, probablemente mediado por el eje GH-IGF-I (Serra-Prat, Palomera, Roca, & Puig-Domingo 2010). Sin embargo, no existen datos sobre el papel de la obestatina en la fuerza muscular y la capacidad funcional en los ancianos.

Aunque los estudios de Nogueiras et al (Nogueiras, Pfluger, Tovar, Arnold, Mitchell, Morris, Perez-Tilve, Vazquez, Wiedmer, Castaneda, DiMarchi, Tschop, Schurmann, Joost, Williams, Langhans, & Dieguez 2007) no observaron ningún efecto de la obestatina en la secreción de

GH, los estudios de Zizzari et al (Zizzari, Longchamps, Epelbaum, & Bluet-Pajot 2007) sugieren que la obestatina actúa regulando la secreción de GH de una manera similar a como inhibe la ingesta, ejerciendo un efecto indirecto negativo a través de la ghrelina. Estos estudios vieron que la obestatina sólo fue efectiva in vivo en la inhibición de la estimulación que la ghrelina ejerce sobre los niveles de GH; ex vivo, la ghrelina estimuló rápidamente la liberación de GH, mientras que la obestatina no afectó la secreción de GH, ni espontáneamente ni inducida por ghrelina. In vivo, la administración de GH aumentó a los 5 minutos la secreción de GH. Esto sugiere que la obestatina no modifica los niveles de GH pero inhibe de forma marcada la secreción de GH inducida por ghrelina.

De hecho, un estudio posterior apoya estos datos demostrando cómo se produce la estimulación de la secreción de GH (Feng et al 2011). En este estudio se utilizaban ratones transgénicos con eGFP (green fluorescent protein) dirigido a las neuronas GHRH, y en él se vio que la estimulación de la secreción de GH estaba mediada por GABA y no por glutamina, ya que la perfusión de ghrelina no modificó de forma significativa la amplitud de la respuesta glutamérgica, mientras que inhibió la amplitud de respuesta mediada por GABA. Para confirmar que la disminución de la actividad mediada por GABA se producía través de GHS-R1a en neuronas GHRH-eGFP, se hicieron experimentos con BIM28163, que es un antagonista selectivo del GHS-R1a. Por si sólo BIM28163 no modificó la actividad GABAérgica, pero sí suprimió la respuesta inducida por ghrelina. Estos datos, por lo tanto, sugieren que el descenso de la actividad GABA inducida por ghrelina se producen básicamente a nivel postsináptico de los receptores GHS-R1a, aunque la ghrelina puede modular también la liberación de GABA a nivel presináptico en un número pequeño de neuronas GHRH. La perfusión de obestatina por sí sola no modificó la respuesta sináptica en las neuronas GABAérgicas, sin embargo, el descenso inducido por ghrelina fue abolido totalmente al producirse la administración simultánea de ghrelina y obestatina. Este efecto de obestatina no parece mediado por GHS-Rs, ya que al añadir obestatina no se modificó la internalización GHS-R-eGFP inducida por el aumento de concentraciones de ghrelina. Todo ello apunta a que la ghrelina y la obestatina actúan sobre las neuronas GHRH del núcleo arcuato para modular la liberación hipotalámica de GHRH. Mientras que la ghrelina aumenta la excitabilidad de las neuronas GHRH incrementando su potencial de acción y disminuyendo el efecto inhibitorio mediado por GABA vía activación de GHS-R1a, la obestatina no actúa directamente sobre las neuronas hipotalámicas GHRH pero puede contrarrestar la acción de ghrelina bloqueando la transmisión GABAérgica, la despolarización de la membrana y los potenciales de acción mediados por

ghrelina, revirtiendo en consecuencia el efecto excitador de la ghrelina en la liberación de GHRH hipotalámica y de la excitabilidad de las neuronas GHRH.

Asimismo existen algunos estudios que muestran el papel de la ghrelina en los miocitos, inhibiendo la muerte celular de los cardiomiocitos y las células endoteliales (Baldanzi et al 2002), favoreciendo la diferenciación y fusión de las células del músculo esquelético (Filigheddu et al 2007), con efecto anabólico (Sheriff et al 2012).

Dada la asociación entre niveles de IGF-I y ghrelina reportada por nuestro grupo en los sujetos del Estudio de Envejecimiento de Mataró, la asociación positiva entre niveles de ghrelina y fuerza muscular y entre pérdida de ghrelina y pérdida de capacidad funcional (Serra-Prat, Palomera, Roca, & Puig-Domingo 2010), resulta interesante valorar el papel que pueda tener la obestatina en la capacidad funcional de nuestra muestra.

7.ADRENOPAUSIA: AFECTACIÓN DEL EJE ADRENAL

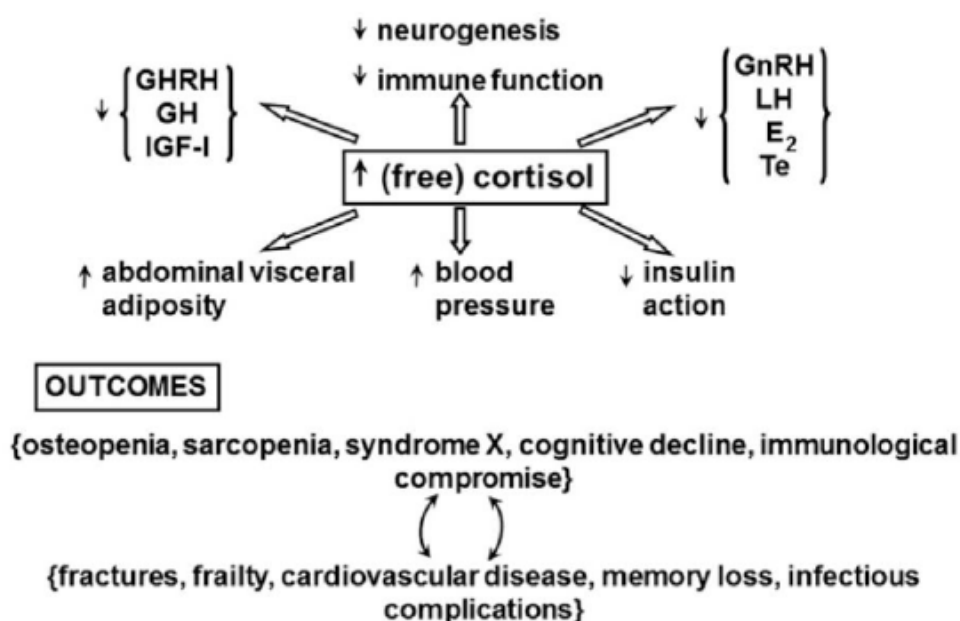
El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) es un sistema autorregulado con muchos mecanismos de modulación, lo que lleva a que los niveles circulantes de GC sean muy fluctuantes, con variaciones acordes al ritmo circadiano y a las situaciones de estrés. Durante el envejecimiento fisiológico, y más aún en el envejecimiento patológico, se producen cambios degenerativos a nivel neuronal, que especialmente afectan a neuronas del hipotálamo, el hipocampo, la región límbica y del núcleo supraquiasmático, que lleva a una reducción del número de receptores de GC y a una alteración en la sensibilidad a los esteroides, afectando al ritmo circadiano y llevando a un cierto grado de hiperactividad del eje en los anciano (Sapolsky et al 1986). Del cortisol plasmático total, aproximadamente el 6% se encuentra libre, mientras que el 80% se encuentra unido a la globulina transportadora de cortisol (CBG -cortisol-binding globulin-) y el 14% a la albúmina. Su vida media es de 35-65 min, aunque puede ser mayor cuando hay niveles altos de CBG en mujeres en tratamiento con estrógenos (Bergendahl et al 2000).

En el envejecimiento, el ritmo circadiano de cortisol se mantiene, pero con un significativo aumento de los niveles nocturnos absolutos en los sujetos ancianos aparentemente sanos, y mucho más marcado en la demencia, en comparación con los sujetos jóvenes (Ferrari, Cravello, Muzzoni, Casarotti, Paltro, Solerte, Fioravanti, Cuzzoni, Pontiggia, & Magri 2001). En el envejecimiento del cerebro tanto fisiológico como patológico, y en controles jóvenes, el estudio del ritmo circadiano del cortisol, antes y después de la administración oral de 1 mg de dexametasona a las 23h, detecta un alto porcentaje de “no respondedores” (niveles de cortisol superiores a 5 µg/dl por la mañana) tanto en ancianos sanos (un 30%) como en ancianos con demencia (un 50%); además, los ancianos con demencia muestran un retraso en la respuesta a la dexametasona (Ferrari et al 1995; Ferrari, Cravello, Muzzoni, Casarotti, Paltro, Solerte, Fioravanti, Cuzzoni, Pontiggia, & Magri 2001). Asimismo, con el envejecimiento también se ha visto que, independientemente de que los valores nocturnos son más elevados, existe una menor diferencia entre el pico y el nadir de las 24h (Deuschle et al 1997) y también un patrón de secreción de cortisol más irregular y desestructurado (Bergendahl, Iranmanesh, Pastor, Evans, & Veldhuis 2000). Múltiples estudios clínicos muestran un adelanto del pico de cortisol (a las 6.30h en los ancianos vs a las 9h en los jóvenes), así como un aumento del nadir circadiano de la media noche (Deuschle, Gotthardt, Schweiger, Weber, Korner, Schmider, Standhardt, Lammers, & Heuser 1997; Heaney et al 2012). Alteraciones en el sueño (menor sueño profundo, despertar precoz) son frecuentes en los ancianos y podrían en parte explicarse por todos estos fenómenos de modificación de las características del ciclo circadiano del cortisol. El grado en que estas alteraciones reflejan o causan discapacidad funcional, ansiedad, depresión, ingesta calórica, no están claras (Heaney, Phillips, & Carroll 2012). Un tema que todavía está por resolver es si el deterioro cognitivo en los ancianos está influido o bien causa aumento en el cortisol, ya que los datos actuales no excluyen efectos bidireccionales (Ferrari, Cravello, Muzzoni, Casarotti, Paltro, Solerte, Fioravanti, Cuzzoni, Pontiggia, & Magri 2001; Veldhuis et al 2013). No existen claras diferencias en los niveles de secreción de cortisol por sexo (Veldhuis, Sharma, & Roelfsema 2013), pero parece que las concentraciones elevadas de GC y la alteración en la supresión de ACTH y cortisol por dexametasona se correlacionan con mayor edad y peor función cognitiva (O'Brien et al 1994; Fonda et al 2005), sin embargo algunos datos son controvertidos (Veldhuis, Sharma, & Roelfsema 2013). Asimismo, hay que considerar que existen múltiples estresores en ancianos que condicionan modificaciones en el eje HHA, entre ellos la depresión (que aumenta el cortisol con la edad en ambos sexos y aumenta el cortisol tras dexametasona/CRH con la edad) o la hipoglicemia (Veldhuis, Sharma, & Roelfsema 2013).

La hiperactivación del eje HHA se asocia a múltiples efectos adversos, tal y como se muestra en la siguiente figura (figura 7). Un aumento del cortisol (libre) se asocia a efectos adversos en distintos sistemas (Veldhuis, Sharma, & Roelfsema 2013).

La DHEA y su sulfato, la DHEAs, son los esteroides más abundantes en humanos. Mientras la DHEA se produce fundamentalmente en las adrenales, aunque una pequeña proporción lo hace también en los testículos, los ovarios, la piel y el cerebro, la DHEAs se produce exclusivamente a partir de la DHEA en la zona reticular de la adrenal, zona rica en actividad sulfuril transferasa. La ACTH estimula la secreción de DHEA pero tiene escasa acción sobre la DHEAs. La vida media de la forma sulfato es superior a la de la DHEA y supone una reserva estable de la segunda (vida media de la DHEAs de 10-20 horas en comparación a 1-3 horas de la DHEA). La DHEAs es posteriormente transformada en los tejidos a DHEA mediante sulfotransferasas (Davis et al 2011).

Figura 7. Posibles secuelas clínicas de la excesiva activación del eje HHA (Veldhuis, Sharma, & Roelfsema 2013).



Aunque los niveles de DHEA y DHEAs son altos al nacimiento, estos decaen drásticamente durante el primer año de vida, para volver a subir posteriormente en torno a los 6-8 años con la adrenarquia, y alcanzando su pico en la tercera década de la vida. A partir de entonces las concentraciones suelen descender a razón de 1-2% al año, alcanzando en torno a los 70-80 años un 20-30% del pico propio de la juventud (Labrie et al 1997). En la mujer premenopáusica se producen diariamente unos 6-8 mg de DHEA, de los cuales el 50% se producen por la adrenal y 1-2 mg por el ovario, y el resto por tejidos periféricos. En las mujeres postmenopáusicas, la producción ovárica decae prácticamente a cero, haciendo de la adrenal la principal productora de estrógenos y testosterona a través de la DHEA (Panjari & Davis 2010; Davis, Panjari, & Stanczyk 2011). En el hombre, la DHEA se produce fundamentalmente en las adrenales (solamente un 10% es secretada por los testículos).

Las modificaciones de DHEA asociadas a la edad sugieren la existencia de un fenómeno de “adrenopausia” caracterizado por un descenso de los niveles de DHEA y niveles mantenidos de cortisol (Baulieu et al 2000). Los niveles de DHEA se encuentran en torno a 1,33 ng/ml y 7,78 ng/ml entre los 18 y 40 años, mientras que a partir de los 40 años, están entre 0,63 ng/ml y 4,7 ng/ml, tanto en hombre como mujeres (Kushnir et al 2010). En torno a los 70-80 años, los niveles pueden no alcanzar más del 10-20% del observado en los adultos jóvenes (Genazzani et al 2007), siendo además los niveles más bajos en mujeres que hombres (Lebrun et al 2006). No se conocen completamente los mecanismos por los que decae la DHEA con la edad, pero parece que están más relacionados con un descenso en la producción adrenal que cambios en el metabolismo (Legrain et al 2000).

El papel de la DHEA y la DHEAs sólo se conoce parcialmente. Se consideran prohormonas, donde la DHEAs es hidrofílica y actuaría como una hormona circulante en stock, mientras que la DHEA es lipofílica y se podría transformar en los tejidos periféricos en andrógenos y estrógenos más potentes. En la mujer antes de la menopausia, el 50-75% de los estrógenos y la mayoría de los andrógenos se producen a través de mecanismos intracrininos a partir de la DHEA. Sin embargo, tras la menopausia, prácticamente la totalidad de los andrógenos y estrógenos se producen a nivel tisular. En los hombres, cuyos testículos son capaces de producir andrógenos a lo largo de toda la vida, el papel de la producción local hormonal es más difícil de valorar (Genazzani, Lanzoni, & Genazzani 2007). Además de estos efectos, datos

recientes sugieren que la DHEA también tendría efectos directos a través de receptores específicos (Samaras et al 2013).

Existen datos que sugieren un papel de la adrenopausa con los procesos asociados al envejecimiento. Estudios en ancianos apoyan la asociación positiva entre niveles de DHEA y masa muscular, fuerza, movilidad y menor riesgo de caídas (Ravaglia et al 1997;Valenti et al 2004). Sin embargo, otros estudios no han podido demostrar dicho efecto (Percheron et al 2003;Igwebuike et al 2008). Las diferencias entre los estudios podrían deberse a un efecto moderado de la DHEA, así como diferencias en el diseño de los mismos. Y aunque la asociación entre la DHEA y las alteraciones musculo-esqueléticas parece clara, su posible uso terapéutico todavía no lo está (Samaras, Samaras, Frangos, Forster, & Philippe 2013). Por otro lado, parece que la DHEA juega un papel en la densidad mineral ósea (DMO). Estudios in vitro en osteoblastos humanos han mostrado actividad aromatasa transformando la DHEA en estrona (Nawata et al 1995) y otros estudios han visto que la DHEA inhibe la apoptosis y favorece la proliferación de osteoblastos de ratas, independientemente de estrógenos y andrógenos (Wang et al 2007b). Todo esto apoya el efecto positivo de la DHEA en el hueso, ya sea a través de la conversión a estrógenos, como por mecanismos independientes. En un estudio con mujeres postmenopáusicas de entre 51 y 99 años, la DMO lumbar se correlacionó positivamente con DHEAs pero no con estradiol (Nawata, Tanaka, Tanaka, Takayanagi, Sakai, Yanase, Ikuyama, & Haji 1995), y la DHEA se asoció positivamente con la DMO en hombres (Clarke et al 2002) y mujeres postmenopáusicas (Nawata, Tanaka, Tanaka, Takayanagi, Sakai, Yanase, Ikuyama, & Haji 1995). Existen numerosos estudios que reportan el efecto positivo de DHEA en la DMO tanto de cadera como lumbar, y tanto en mujeres postmenopáusicas como hombres (Samaras, Samaras, Frangos, Forster, & Philippe 2013).

Estudios in vitro y clínicos, sugieren un efecto neuroprotector de la DHEA y sus metabolitos, especialmente a través de la estimulación de "stem cell" neuronales dependientes de DHEA, la modulación de la actividad genómica y la sobreexpresión de receptor de andrógenos (Lu et al 2003;Suzuki et al 2004), así como un efecto inhibitor sobre proteínas proinflamatorias, como TNF α e IL-6 (Traish et al 2011). Se ha visto que niveles de citoquinas podrían afectar a la proteína precursora del amiloide, aumentando la producción de péptidos que contribuyen a la formación de la placa de amiloide. Sin embargo, no hay datos específicos sobre el efecto inmunoregulador de la DHEA en la prevención de la demencia. Desde el punto de vista clínico,

los niveles de DHEAs se han correlacionado con una mejor función ejecutora y mejores puntuaciones en el MiniMental State Examination (MMSE) (Davis et al 2008;Valenti et al 2009); sin embargo, otros estudios han mostrado una correlación inversa (Morrison et al 2000) o la ausencia de correlación (Barrett-Connor & Edelstein 1994). Asimismo, la DHEA podrían tener un efecto sobre el estado de ánimo con un cierto efecto antidepresivo, por aumento de la actividad de neuronas secretoras de 5-hidroxitriptamina, así como efectos sobre la dopamina, glutamina y GABA (Traish, Kang, Saad, & Guay 2011). Desde el punto de vista clínico, los estudios sugieren una relación positiva entre niveles más altos de DHEA y bienestar psicológico en los ancianos (Davis, Panjari, & Stanczyk 2011).

Existen datos contradictorios sobre el efecto de la DHEA en el perfil lipídico, la obesidad y la sensibilidad a la insulina (Samaras, Samaras, Frangos, Forster, & Philippe 2013); sin embargo, múltiples estudios sugieren un efecto protector frente la aterosclerosis, la ECV y la mortalidad (Samaras, Samaras, Frangos, Forster, & Philippe 2013). El efecto antiateroesclerótico de la DHEA se debería a mecanismos independientes al perfil lipídico, a través de la transformación a estrógenos y testosterona, a sus efectos antiinflamatorios y la estimulación directa sobre la eNOS (Hayashi et al 2000;Traish, Kang, Saad, & Guay 2011;Wang et al 2011). Otros estudios clínicos han mostrado una correlación inversa entre DHEA y el GIM carotídea (Yoshida et al 2010), y que los niveles bajos de DHEA se asocian a enfermedad isquémica incipiente (Feldman et al 2001), aterosclerosis coronaria severa (Herrington 1995) y fallo cardíaco (Nakamura et al 2004). Asimismo, la mortalidad tanto CV como global fueron mayores en mujeres postmenopáusicas con niveles bajos de DHEAs y enfermedad coronaria tras 6 años de seguimiento (Shufelt et al 2010) y en hombres (Barrett-Connor et al 1986), aunque otros estudios no han mostrado asociación con mujeres postmenopáusicas (Barrett-Connor & Goodman-Gruen 1995a). Con todo esto, parece que los datos hasta ahora sugieren que hay una relación inversa entre los niveles de DHEA y el riesgo CV, sin embargo no hay datos suficientes que apoyen la administración de DHEA (Samaras, Samaras, Frangos, Forster, & Philippe 2013) para prevenirlo.

Finalmente, la DHEA podría jugar un papel en la esfera sexual y en la sintomatología menopáusica. Los niveles bajos de DHEA se asocian a mayor riesgo de disfunción eréctil (Basar et al 2005) y la suplementación con DHEA se correlaciona con mejoría de ésta, del deseo y la actividad sexual (Reiter et al 2001). En el caso de las mujeres pre y postmenopáusicas, también

se ha visto que aquellas con niveles bajos de DHEAs tenían menor respuesta sexual (Davis et al 2005) y que la suplementación con DHEA en mujeres postmenopáusicas aumenta el deseo, la fantasía, la lubricación, la actividad, el interés, la satisfacción y el orgasmo (Genazzani et al 2011), e incluso la administración intravaginal tendría efectos similares sin aumentar los niveles de esteroides. Igualmente, también se ha visto mejoría de la sintomatología menopáusica tras su administración, mejorando la atrofia vaginal tras la administración local, sin que se haya visto un aumento del grosor del endometrio ni mayor riesgo de cáncer de mama (Stomati et al 2000;Labrie et al 2009).

Es por todo ello que se ha considerado a la DHEA como el “elixir de la juventud” por lo que actualmente es usada sin rigurosidad como tratamiento antienvjecimiento (Lamberts, van den Beld, & van der Lely 1997). Sin embargo, se trata de una prohormona, cuyos efectos pueden ser imprevisibles si lo comparamos con hormonas efectoras, por lo que se considera que el tratamiento con DHEA está más cerca de la “optimización hormonal” que de la “suplementación hormonal” (Samaras, Samaras, Frangos, Forster, & Philippe 2013). Son necesarios más estudios para valorar la seguridad de una suplementación a largo plazo.

Con todo ello parece que con el envejecimiento hay una alteración en el patrón de secreción adrenocortical, debido a un relativo mantenimiento de la secreción de cortisol y una clara disminución de los niveles de andrógenos, especialmente en los demenciados. Todo ello lleva a un aumento del ratio cortisol/DHEAs tanto en el envejecimiento fisiológico como el patológico (Ferrari, Cravello, Muzzoni, Casarotti, Paltro, Solerte, Fioravanti, Cuzzoni, Pontiggia, & Magri 2001).

7.1.POLIMORFISMOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

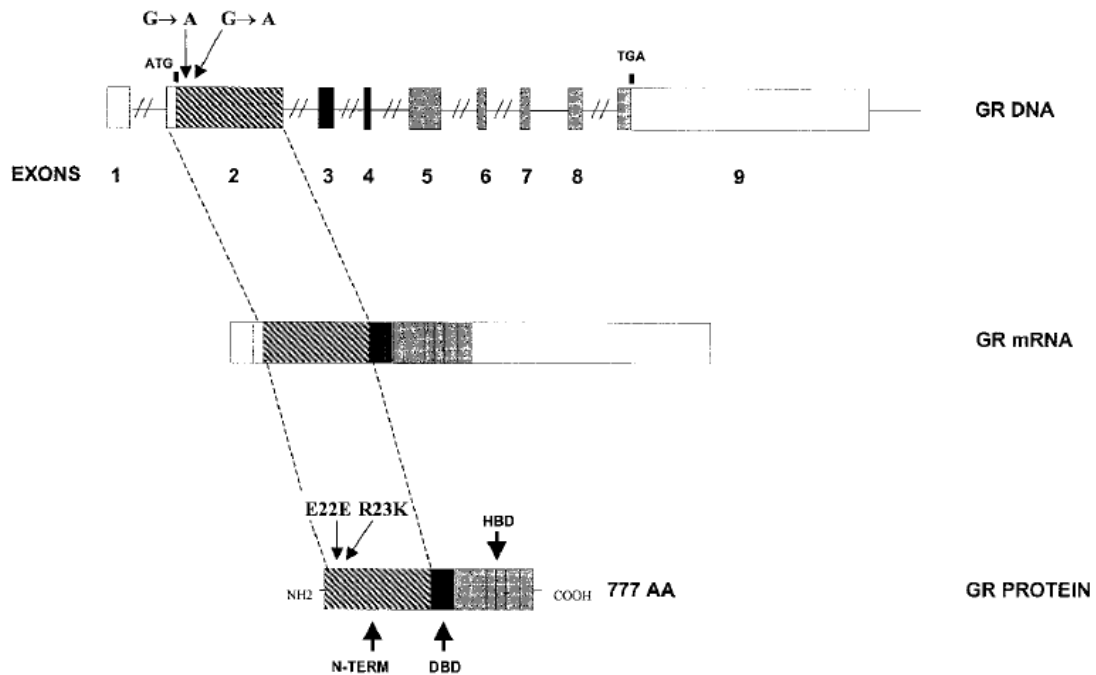
La mayor o menor sensibilidad a la acción de los GC puede condicionar un efecto deletéreo a nivel muscular y facilitar el acúmulo graso intrabdominal, propiciando asimismo el desarrollo de SM. Los efectos de los GC están básicamente mediados a través del receptor de GC. Modificaciones en el gen codificante para este receptor pueden jugar un papel importante en la determinación de la sensibilidad a los GC (DeRijk et al 2002).

En estudios recientes, fundamentalmente derivados del Estudio de Envejecimiento de de Rotterdam, se han conseguido identificar diversos polimorfismos del gen del receptor de GC de potencial interés en este tema (Koper et al 1997). Uno de estos polimorfismos, el N363S mostró una asociación con una mayor sensibilidad a los GC y un mayor IMC (Huizenga et al 1998) y de obesidad central en varones (Dobson et al 2001), aunque otros estudios no han mostrado ningún efecto (Echwald et al 2001; Rosmond et al 2001). El polimorfismo BcII se ha asociado a hipersensibilidad a los GC (Panarelli et al 1998), a un aumento de la respuesta del cortisol a la comida y a obesidad central en adultos de mediana edad (Rosmond et al 2000).

Otro de los polimorfismos identificado consiste en dos cambios puntuales en los codones 22 y 23 del gen del receptor de GC (GAG AGG -> GAA AAG). El primer cambio en el codón 22 es silente, por lo que tanto GAG como GAA codificarían para el ácido glutámico (E). Sin embargo, el segundo que afecta al codón 23 de AGG a AAG, resulta en un cambio de aminoácido de arginina (R) a lisina (K) (Koper, Stolk, de, Huizenga, Moliijn, Pols, Grobbee, Karl, de Jong, Brinkmann, & Lamberts 1997) (figura 8).

El mecanismo por el cual actuaría esta polimorfismo no está del todo claro, pero esta variante se encuentra localizada cerca del dominio de transactivación, lo que podría alterar la actividad de los genes o podría ocasionar diferencias en la unión con las proteínas, afectando la estabilidad del ARNm e influyendo en la sensibilidad a los GC (van Rossum et al 2004b). A través de estudios del grupo de Rotterdam (van Rossum et al 2002) se ha visto que este polimorfismo ER22/23EK podría condicionar una resistencia relativa a los GC en los sujetos portadores, ya que los niveles de cortisol tras la supresión con 1 mg de dexametasona fueron significativamente mayores en los portadores ER22/23EK en comparación con los no portadores, aunque sin diferencias tras la administración de 0,25 mg de dexametasona. Asimismo, se vio que los portadores ER22/23EK presentaban un mejor perfil metabólico, con cifras más bajas de colesterol total y LDL, una tendencia a niveles más bajos de insulina antes y después del test de supresión con 1 mg de dexametasona y una mejor sensibilidad a la insulina.

Figura 8. Estructura del gen humano del receptor de GC, ARNm, proteína y dominios funcionales. Representación de los cambios de nucleótidos en los codones 22 y 23 (van Rossum, Koper, Huizenga, Uitterlinden, Janssen, Brinkmann, Grobbee, de Jong, van Duyn, Pols, & Lamberts 2002) (N-TERM, dominio NH2-terminal; DBD, DNA binding domain; HBD, hormone binding domain).



El hecho que no se encuentren diferencias con variables antropométricas, presión arterial, triglicéridos o HDL, sugiere que el grado de resistencia es muy pequeña, puesto que otras rasgos como la hipertensión, la hipokaliemia o el acné que se ve en resistencias a GC sintomáticas, no se ven en los portadores de este polimorfismo. El mismo grupo también objetivó que los portadores heterocigotos son unos 4 cm más altos que los no portadores, tienen más masa magra pero sin diferencias en masa grasa, así como mayor masa y fuerza muscular en brazos y piernas, especialmente en varones. En cambio, en mujeres, parece que las portadoras del polimorfismo presentarían una mayor tendencia a menor perímetro de cintura y cadera, por lo que este polimorfismo estaría implicado en efectos beneficiosos a nivel de composición corporal, sexo específicos en adultos jóvenes (van Rossum, Voorhoeve, te Velde, Koper, Delemarre-van de Waal HA, Kemper, & Lamberts 2004b). Finalmente, los niveles de proteína C reactiva son más bajos, con una mayor supervivencia a 4 años en los portadores ER22/23EK (van Rossum et al 2004a).

8.MENOPAUSIA Y ANDROPAUSIA: AFECTACIÓN DEL EJE GONADAL

El envejecimiento se asocia con una pérdida de hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos), que a su vez serían responsables de pérdida de masa muscular, debilidad e incapacidad funcional.

8.1.MENOPAUSIA

La menopausia es un proceso natural que se produce como parte del envejecimiento fisiológico en las mujeres y se define por la Organización Mundial de la Salud como la cesación permanente del periodo menstrual que ocurre de forma natural o inducida por cirugía, quimioterapia o radiación (Soules et al 2001). La menopausia natural se reconoce después de 12 meses consecutivos sin menstruaciones que no están relacionadas con causas fisiológicas (por ejemplo la lactancia) o patológicas, y que van seguidas de la pérdida de la actividad ovárica. Según el Massachusetts Women's Health Study, en el cual se estudiaron 2570 mujeres, la media de edad de la menopausia es de 51,3 años (McKinlay et al 1992). La edad de aparición de la menopausia se reduce 1,5 años aproximadamente en las fumadoras, y es más temprana en las mujeres más delgadas, mientras que el consumo de alcohol se asocia a una menopausia más tardía. Parece que tanto las madres como las hijas acostumbran a presentar la menopausia a edades similares (Edwards & Li 2013). Dado que la esperanza de vida ha ido aumentando progresivamente, es de esperar que las mujeres vivan más de un tercio de sus vidas sin hormonas ováricas, por lo que el manejo de la menopausia tiene una gran relevancia clínica.

Antes de la menopausia, hay un periodo de unos 2-8 años en el que se produce una acelerada pérdida ovárica con ciclos anovulatorios, que se correlaciona con un aumento de la hormona folículoestimulante (FSH) y un descenso de la inhibina. Durante estos años los niveles de FSH sube por encima de 20 IU/l, las menstruaciones continúan y se forman cuerpos lúteos ocasionalmente, por lo que el embarazo es posible. Justo después de la menopausia pueden quedar algunos folículos, la FSH se multiplica en 10 ó 20 veces y la LH unas 3, alcanzando los niveles máximos a los 1-3 años; posteriormente hay un declive progresivo en las gonadotropinas (Chakravarti et al 1976).

En el ovario postmenopáusico se fabrica primariamente androstendiona y testosterona. La mayor parte de la androstendiona se sintetiza en las adrenales, y sólo una pequeña proporción lo hace el ovario. Los niveles de DHEA y DHEAs, originadas en las glándulas adrenales, decaen de forma marcada con el envejecimiento como ya hemos comentado previamente, siendo los niveles tras la menopausia un 70% inferiores a los niveles del adulto joven. La producción de la testosterona decae un 25% tras la menopausia, sin embargo, el ovario postmenopáusico secreta más testosterona que el ovario premenopáusico. Esto se debe a que cuando los folículos han desaparecido y los niveles de estrógenos bajan, los niveles altos de gonadotropinas llevan al estroma ovárico residual a la producción elevada de testosterona. Sin embargo, la producción global de testosterona se reduce, ya que la fuente primaria, conversión periférica a partir de androstendiona, se reduce en un 60% (Labrie, Belanger, Cusan, Gomez, & Candas 1997; Edwards & Li 2013).

Los niveles de estradiol tras la menopausia van de 10 a 20 pg/ml, y la mayoría de ellos proceden de la conversión periférica de la estrona, que a su vez deriva de la conversión periférica de la androstendiona. Los niveles circulantes de estrona (30-70 pg/ml) en las mujeres postmenopáusicas acostumbran a ser mayores que los niveles de estradiol (45 pg/24h) (Edwards & Li 2013). Esta conversión periférica está modulada por el peso, y aunque virtualmente todos los tejidos tienen la capacidad de aromatizar andrógenos, básicamente se produce en el tejido adiposo.

La menopausia se asocia a una gran variedad de manifestaciones clínicas, entre ellas la inestabilidad vasomotora (sudoración y sofocaciones), atrofia de los tejidos genitourinarios, deterioro cognitivo, alteraciones en el estado de ánimo, y otras condiciones asociadas al descenso de estrógenos como la pérdida de masa ósea, osteoporosis y posiblemente un aumento de la morbilidad cardíaca.

El riesgo de fracturas óseas aumenta exponencialmente tras la menopausia, ocurriendo generalmente la fractura de muñeca en la sexta década de la vida, la fractura vertebral en la séptima y la de cadera en la octava década de la vida. En los varones osteoporóticos suele ocurrir en edades posteriores. Los factores genéticos determinan el 50-90% de la masa y calidad ósea, siendo la adolescencia un periodo especialmente crítico para la salud del hueso.

A partir de los 40-50 años, hay una pérdida de masa ósea progresiva lenta en ambos sexos, con una mayor caída durante la menopausia, asociada a una pérdida del 12-20% en un periodo de unos 5 años. Posteriormente la pérdida es más modesta (un 0,6%/año), pero debido a la esperanza de vida, la pérdida final puede llegar a ser del 40% (Riggs et al 2002).

La ECV es la primera causa de mortalidad de las mujeres en el mundo occidental. El riesgo de ECV aumenta tras la menopausia, debido a los cambios metabólicos que se producen durante este periodo. Las mujeres premenopáusicas están protegidas frente a la ECV en comparación a los varones de la misma edad, sin embargo el riesgo se iguala en torno a los 70 años, lo que sugiere que el déficit estrogénico provoca una rápida aceleración en el riesgo CV (Carr 2003). La pérdida de la función ovárica puede contribuir a este riesgo afectando a factores de riesgo CV como alterar el perfil lipídico, cambios en la composición corporal (obesidad central), acción de la insulina, fibrinólisis y cambios en la pared vascular. Todos estos factores pueden contribuir a un aumento del SM en las mujeres postmenopáusicas (Kannel & Wilson 1997). Hay un incremento significativo del colesterol total, el LDL y la apolipoproteína B, que pueden contribuir a la formación de placa de ateroma, especialmente si se suman otros factores de riesgo como la obesidad, el hábito tabáquico o la hipertensión. Además, a partir de los sesenta, las mujeres tienen una presión arterial mayor (Harrison-Bernard & Raji 2000). Esto es debido a múltiples factores, entre ellos a un aumento de la actividad de la renina y de la actividad simpática, una vasoconstricción ocasionada por la falta de estrógenos (los estrógenos actúan en la síntesis del óxido nítrico favoreciendo la vasodilatación), y a un aumento de la sensibilidad a la ingesta de sodio en la dieta (Edwards & Li 2013).

La ganancia de peso es frecuente durante la menopausia. Estudios epidemiológicos hechos en mujeres postmenopáusicas bajo THS han sugerido que el déficit de estrógenos se asocia a ganancia de peso, mientras que el tratamiento hormonal a pérdida de peso (Espeland et al 1997). Los estrógenos juegan un papel importante en la regulación de la distribución de la grasa corporal en la mujer, favoreciendo la acumulación de grasa glúteo-femoral. La pérdida de estrógenos se asocia a un aumento de la obesidad abdominal, lo que aumentaría la resistencia a la insulina (Poehlman et al 1995). Varios grupos han observado un incremento de los niveles de insulina y glucosa basal en mujeres postmenopáusicas en comparación con las premenopáusicas, lo que empeoraría la resistencia a la insulina (Edwards & Li 2013). Además, la postmenopausia se asocia a un 60% más de riesgo de SM, incluso tras ajustar por edad, IMC

o inactividad física (Park et al 2003). El riesgo de ECV atribuido al SM es alto en mujeres, y se estima que la mitad de los eventos EV en las mujeres están relacionados con el SM (Wilson et al 1999).

8.2.ANDROPAUSIA

Aunque no resulta tan evidente ni abrupta como la menopausia en las mujeres, en los varones existe una caída progresiva de los niveles de testosterona, que empieza entre los 35-40 años, con un descenso progresivo del 1-3% cada año (Feldman et al 2002) y que es conocida como andropausia. Aproximadamente el 20% de los varones de más de 60 años y el 50% de los mayores de 80 años tienen concentraciones de testosterona por debajo de los valores del varón joven (Harman et al 2001). Este descenso en los niveles de la testosterona estaría debido en parte a la pérdida de masa de células de Leydig con la edad y a alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La FSH está inicialmente involucrada en la producción de esperma y la LH en la secreción de testosterona. Esta última activa la síntesis y secreción de testosterona por las células de Leydig, donde se produce el 95% de la testosterona, siendo los niveles de los hombres, 20 ó 25 veces superior al de la mujer (Horstman et al 2012). La caída de testosterona que se produce en la andropausia es debida en algunos casos a un hipogonadismo primario con una menor síntesis de testosterona a pesar de un aumento de los niveles de LH. Sin embargo, a menudo, los niveles de LH no suben en paralelo al descenso de la testosterona por alteraciones a nivel de la GnRH y alteraciones en los mecanismos de retroalimentación. Además, también suele producirse un aumento de los niveles de SHBG y de aromatasa (que aumenta la conversión a estrógenos) y un descenso la actividad de la 5 α reductasa (que convierte la testosterona en dihidrotestosterona) (Lang et al 2012). Además, existen otros factores que pueden contribuir a este descenso, como factores genéticos, enfermedades crónicas, medicación, consumo de tabaco o alcohol, la dieta o situaciones de estrés (Valenti 2005), y también la obesidad y el SM se han asociado a un descenso significativo en los niveles de testosterona (Kaplan et al 2006).

Clínicamente esta andropausia se manifiesta en forma de un aumento de la masa grasa, pérdida de masa muscular y ósea, que puede llevar a limitaciones funcionales, como problemas de equilibrio, mayor riesgo de caídas, así como también fatiga, depresión, alteraciones en el estado de ánimo y cognitivas, anemia, baja libido, disfunción eréctil, apneas

del sueño, resistencia a la insulina y mayor riesgo CV (Lang, Samaras, & Samaras 2012). Sin embargo, estos síntomas suelen ser más sutiles y de instauración más progresiva en comparación a lo que sucede en la menopausia. Además cabe considerar que hay individuos con niveles bajos de testosterona asintomáticos o con poca clínica, y al mismo tiempo hay casos de sujetos con clínica aparentemente relacionada y niveles de testosterona normal. La relevancia clínica de la asociación entre niveles hormonales y síntomas es incierta, ya que la determinación de testosterona en los varones no forma parte de la práctica clínica habitual en ausencia de sintomatología.

El envejecimiento se asocia con una pérdida de potencia e interés sexual, aunque no queda clara su asociación con los niveles de testosterona (Kupelian et al 2006b;Wu et al 2010). Por el contrario, parece más clara la asociación entre riesgo de osteoporosis (Fink et al 2006) y de fractura (Meier et al 2008) y niveles bajos de testosterona, y la asociación entre niveles de testosterona y masa muscular, fuerza y actividad física (Schaap et al 2005;O'Donnell et al 2006;Maggio et al 2011). En estudio epidemiológicos, los niveles bajos de testosterona se consideran un factor de riesgo per se de desarrollo de obesidad central, con resistencia a la insulina, DM2, SM, aumento de la proteína C reactiva y finalmente mayor mortalidad (Oh et al 2002;Kupelian et al 2006a;Tivesten et al 2009). También se ha encontrado asociación entre el déficit de andrógenos y una gran variedad de síntomas psicológicos, de comportamiento y cognitivos, que a menudo se pueden confundir con una depresión mayor o un deterioro cognitivo asociado a la edad (Amore 2005).

Finalmente, se sugiere la asociación recíproca entre los esteroides sexuales y el sistema inmune, donde las hormonas sexuales modularían una gran variedad de fenómenos relacionados con la respuesta inmune, incluyendo la maduración y selección de los timocitos, el tránsito celular, proliferación linfocítica, expresión del complejo II de histocompatibilidad y la producción de citoquinas (Munoz-Cruz et al 2011).

9.FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SUPERVIVENCIA

El proceso de envejecimiento está influido por múltiples factores que combinados entre sí de forma diferente pueden justificar diferencias interindividuales en el mismo y consecuentemente una mayor o menor supervivencia de los ancianos. Factores genéticos, estilos de vida, incluso la accesibilidad a los centros de salud y llevar una vida física y socialmente activa tienen pues un papel relevante en el envejecimiento y la mortalidad. Determinadas características fenotípicas son predictoras de una mayor o menor supervivencia en el envejecimiento, siendo las más representativas el incremento de la masa grasa, la pérdida de masa muscular y la fuerza y el descenso de la densidad mineral ósea. Otras situaciones como la función mental y cognitiva o el apoyo social son también factores muy importantes.

Desde el punto de vista endocrinológico, en las últimas décadas numerosos estudios han prestado atención a los factores metabólicos y el perfil hormonal como factores relevantes que pueden influir en la supervivencia en los ancianos. Los cambios en la composición corporal, la pérdida de la fuerza muscular y la anorexia, así como los cambios en el estado de ánimo y la condición mental, pueden ser debidos, al menos en parte, a cambios en la función endocrina de diferente magnitud.

En relación a los parámetros metabólicos, existen datos que sugieren la asociación entre la presencia de SM o sus componentes, y mayor riesgo de incidencia de ECV y de mortalidad CV y de todas las causas. Sin embargo, no hay consenso al respecto. Algunos estudios en ancianos han mostrado que aquellos con SM tienen un escaso o nulo aumento de riesgo CV en comparación con los que no tienen SM, y que no está asociado con la mortalidad global (Ravaglia et al 2006;Wang et al 2007a), aunque otros sugieren que sí podría predecir la mortalidad CV (Wang, Ruotsalainen, Moilanen, Lepisto, Laakso, & Kuusisto 2007a). Otro tema de interés es el papel de los distintos componentes del SM en la mortalidad CV. Por ejemplo, algún estudio ha mostrado que no todos los componentes del SM contribuyen a un mayor riesgo de mortalidad, siendo la glucosa alterada la que predeciría mayor mortalidad global en una cohorte italiana, y en mujeres, tanto la glucosa alterada como los niveles bajos de HDL (Zambon et al 2009). El perímetro de cintura es probablemente un buen parámetro, mejor que el IMC, para predecir mortalidad, dada su asociación con la adiposidad central y esto podría ser

particularmente importante en los ancianos ya que tienen más grasa visceral en comparación con los jóvenes (Pischon et al 2008). El efecto de la grasa visceral en la resistencia a la insulina y el SM, como es sabido, es más deletéreo que la grasa subcutánea, siendo en consecuencia el perímetro de cintura y el ratio cintura-cadera buenos marcadores de riesgo metabólico en comparación con el IMC (Despres & Lemieux 2006). Mientras la adiposidad visceral es un predictor directo de riesgo cardiometabólico, el perímetro de cadera tiene una asociación inversa con los componentes del SM, la ECV y la mortalidad (Lissner et al 2001;Snijder et al 2004). Sin embargo, los estudios actuales que relacionan el perímetro de la cintura con la mortalidad suelen ser estudios en población más joven, y la extrapolación a poblaciones ancianas puede consecuentemente no ser válida por los distintos factores que en este grupo etario entran en juego en relación a sujetos jóvenes. De hecho, existen datos contradictorios respecto a la asociación entre el IMC y la mortalidad en sujetos ancianos, mostrando algunos estudios una asociación inversa (Janssen et al 2005) y otros nula asociación (Grabowski & Ellis 2001).

Por otro lado, durante el envejecimiento, como ya se ha comentado previamente, se producen cambios en varios sistemas hormonales, principalmente relacionados con una menor secreción hormonal, que pueden influir en los distintos cambios metabólicos mencionados y estos influir en sentido positivo o negativo en la mortalidad. Así, diversos estudios han mostrado que los niveles bajos de IGF-I aumentan el riesgo de mortalidad de causa CV (Laughlin et al 2004) y que los niveles altos de IGF-I bioactiva se asocian a mayor supervivencia y menor riesgo CV (Brugts, van den Beld, Hofland, van der, van Koetsveld, Frystyk, Lamberts, & Janssen 2008). Se ha visto que la esperanza de vida es menor en los individuos con hipopituitarismo y con déficit de GH no tratado (Janssen & Lamberts 2004). Rosen y Bengtsson (Rosen & Bengtsson 1990) atribuyeron este aumento de mortalidad a problemas vasculares. Sin embargo, aunque se ha visto que el hipopituitarismo y el déficit de GH no tratados tienen mayor mortalidad CV, también tienen menor riesgo de cáncer. Hay evidencias epidemiológicas que indican que niveles circulantes elevados de IGF-I se asocian a mayor riesgo de cáncer de mama, próstata, pulmón y colon (Hankinson et al 1998;Chan et al 1998;Lukanova et al 2001).

Varios estudios observacionales han sugerido que el descenso de la testosterona con la edad en los varones, se asocia con obesidad central, SM (Kupelian, Page, Araujo, Travison, Bremner, & McKinlay 2006a), factores de riesgo CV, DM2, dislipemia y mayor mortalidad global y de

causa CV (Araujo et al 2011). Otro estudio muestra que los niveles de testosterona se asocian inversamente con la mortalidad global, de causa CV y por cáncer, con un riesgo del 25-30% menor en el cuartil más alto en comparación con el cuartil más bajo (Khaw et al 2007). Sin embargo, no todos los estudios muestran una asociación entre la testosterona y la mortalidad. El Estudio de Rancho Bernardo reportó 114 muertes de causa CV en 872 hombres de entre 40 y 79 años sin enfermedad CV previamente conocida y seguidos durante 12 años, y no vieron diferencias en los niveles de testosterona en los dos grupos (Barrett-Connor & Khaw 1988). En el estudio Caerphilly con 2512 hombres de entre 45 y 59 años seguidos durante 5 años, de los cuales 153 sufrieron un evento CV, los niveles de testosterona eran similares en ambos grupos (Yarnell et al 1993). El estudio de Framingham tampoco mostró diferencias entre los niveles de testosterona y la enfermedad CV en 2084 hombres seguidos durante 10 años (386 eventos) (Arnlov et al 2006). Esta falta de asociación se ha atribuido a cuestiones metodológicas en la medición de la testosterona y al tamaño de la muestra.

Del mismo modo, la reducción progresiva de la DHEA con el envejecimiento fisiológico, con acción contrapuesta a los GC, y que determinan una mayor acción del cortisol por un aumento del ratio cortisol/DHEA, podría tener un papel en la mortalidad CV, ya que se ha visto una asociación entre mayores niveles de DHEAs con menor mortalidad CV en hombres (Barrett-Connor & Khaw 1987; Ohlsson et al 2010) y que tanto los niveles bajos de DHEA y DHEAs se asocian con mayor mortalidad global y por ECV, especialmente entre los más jóvenes (Ohlsson, Labrie, Barrett-Connor, Karlsson, Ljunggren, Vandenput, Mellstrom, & Tivesten 2010). Barrett-Connor et al también observaron una asociación entre menores niveles de DHEAs y mortalidad CV a 12 años (Barrett-Connor, Khaw, & Yen 1986); sin embargo, no pudieron replicar los resultados en la cohorte de varones con un mayor seguimiento de 19 años (Barrett-Connor & Goodman-Gruen 1995b). Por otro lado, el Massachusetts Male Aging Study no encontró asociación con la mortalidad CV, pero sí con la combinación de eventos CV fatales y no fatales (Feldman, Johannes, Araujo, Mohr, Longcope, & McKinlay 2001). Otros estudios también han mostrado asociación entre menores niveles de DHEAs y progresión aterosclerótica tanto en hombres como mujeres (Herrington et al 1990; Bernini et al 1999), pero sin mostrar una clara asociación con la mortalidad en hombres (Legrain et al 1995; Kahonen et al 2000) y mujeres (Barrett-Connor & Goodman-Gruen 1995a; Trivedi & Khaw 2001; Tchernof & Labrie 2004). Igualmente, también existen datos en las mujeres postmenopáusicas donde se relaciona mayor mortalidad CV y global con menores niveles de DHEAs (Shufelt, Bretsky, Almeida, Johnson, Shaw, Azziz, Braunstein, Pepine, Bittner, Vido, Stanczyk, & Bairey Merz 2010).

10. ESTUDIOS DE ENVEJECIMIENTO EN LA LITERATURA

Existen numerosos estudios de envejecimiento que en los últimos 50 años se han interesado por el proceso de envejecimiento, llevando a multitud de publicaciones. Entre los estudios más destacados se encuentran:

- **Rancho de Bernardo Study:** entre el 1972 y 1974, el 82% de los adultos caucásicos entre 30 y 79 años que vivían en el área geográfica de Rancho Bernardo en el sur de California, participaron en un estudio de factores de riesgo CV (6110 adultos). Los participantes tuvieron una entrevista clínica en el que se incluyó el hábito tabáquico y el uso de THS y se valoraron variables antropométricas. Esta cohorte se ha seguido anualmente con una respuesta del 99%.
- **Massachusetts Male Aging Study:** el Massachusetts Male Aging Study es un estudio observacional que se inició en 1987-1989 con un primer seguimiento en 1995-1997 y un segundo seguimiento en 2002-2004. Se seleccionaron de forma randomizada varones de entre 40 y 70 años seleccionados de 11 pueblos y ciudades del área de Boston (Massachusetts). Se reclutaron inicialmente 1709 varones (tasa de respuesta del 52%). A través de una entrevista telefónica a los no respondedores (n=206) se comprobó que las características de salud eran similares entre los respondedores y los no respondedores. Al primer seguimiento, de los 1709, 1496 fueron elegibles y 1156 completaron la entrevista (tasa de respuesta del 77%). Al segundo seguimiento, 1351 eran elegibles y completaron la entrevista 853 (tasa de respuesta del 63%). La media de seguimiento fue de 14,4 años (rango: 7,1-16,9 años). A los participantes se les obtuvo medidas antropométricas, una muestra de hormonas, cuestionarios de salud y de envejecimiento. La cohorte era fundamentalmente caucásica, casada, con empleo y con estudios universitarios (Feldman, Johannes, Araujo, Mohr, Longcope, & McKinlay 2001; Kupelian, Page, Araujo, Trivison, Bremner, & McKinlay 2006a).
- **Framingham Study:** el Framingham Study es un estudio prospectivo de base poblacional que empezó en 1948 en Framingham, Massachusetts. La cohorte original incluía 5.209 participantes, de 28 a 62 años en la evaluación inicial. Los supervivientes han sido examinados cada dos años desde entonces. Durante cada visita, los

participantes se someten a una detallada historia médica, un examen físico, y una evaluación de los parámetros sanguíneos, de la función cardíaca y pulmonar (Djousse et al 2009).

- **Baltimore Longitudinal Study of Aging:** estudio de cohorte prospectivo longitudinal que inició en 1958 y en el que se incluyeron voluntarios residentes en la comunidad de Baltimore, Maryland, que se sometieron a un examen médico, físico y psicológico a intervalos regulares entre 1977 y 2013.
- **Rotterdam Study:** estudio de cohorte de base poblacional en el que se invitó a participar a todos los residentes de la zona de Rotterdam llamada Ommoord y con edad ≥ 55 años. La recogida de datos se realizó entre marzo de 1990 y julio de 1993 y un total de 7.983 sujetos participaron (tasa de respuesta del 78%) en el estudio. La información relativa a los factores de riesgo CV se obtuvo mediante entrevista y examen físico. Se recogieron medidas antropométricas, presión arterial (Yazdanpanah et al 2006).
- **InCHIANTY Study:** Invecchiare in Chianti (InChianti) es un estudio longitudinal en el que participaron adultos de dos localidades de Italia (Bagno y Ripoli en la Toscana). Los residentes fueron randomizados a partir del registro poblacional y 1155 de 1260 residentes de ≥ 65 años (91.6%) accedieron a participar. Se hizo valoración inicial (entre 1998 y 2000), a los 3 años (entre 2001 y 2003) y a los 6 años (entre 2004 y 2006) (Shardell et al 2012).
- **Leiden 85-Plus Study:** estudio prospectivo de base población en los habitantes de 85 años o más de la ciudad de Leiden en Holanda (der Wiel et al 2002). Entre setiembre de 1997 y setiembre de 1999, eran elegibles 705 individuos nacidos entre 1912 y 1914 que vivían en la ciudad de Leiden y habían alcanzado la edad de 85. No había criterios de exclusión. De entre los 705 individuos elegibles, 92 rechazaron la participación y 14 murieron antes del reclutamiento. Finalmente 599 individuos (87%) firmaron el consentimiento informado y fueron reclutados.

Estos estudios, en su mayoría, no van dirigidos al estudio del envejecimiento exclusivamente, pero de ellos se han obtenido subcohortes para el estudio del envejecimiento, factores de riesgo CV, perfil metabólico y el perfil hormonal y cómo influye éste en el perfil metabólico y en la mortalidad. El interés fundamental de estos estudios son los grandes tamaños muestrales y con un largo seguimiento, lo que da consistencia a sus resultados. Estos estudios también han aportado datos sobre las causas genéticas del envejecimiento, y el papel de ciertos polimorfismos en el envejecimiento, como los polimorfismos de IGF-I y del receptor de GC, especialmente el Rotterdam Study. Sin embargo, el estudio de los factores asociados al envejecimiento sigue siendo controvertido, por lo que los estudios de envejecimiento siguen teniendo interés hoy en día.

En el ámbito nacional, cabe destacar estudios como el Estudio Toledo de Envejecimiento Saludable, estudio longitudinal en el que se incluyeron participantes institucionalizados o no, de más de 64 años, de la provincia de Toledo, y que inició en 2006. En este estudio se pretenden identificar los factores asociados al envejecimiento, la aparición de fragilidad y la mortalidad, y el papel de los cambios inflamatorios y hormonales. Otros estudios a mencionar con repercusión científica son los estudios Octabaix y Nona-Santfeliu.

11. ESTUDIO DE ENVEJECIMIENTO DE MATARÓ

El Estudio de Envejecimiento de Mataró es un estudio observacional de base poblacional que se diseñó para identificar factores de riesgo de fragilidad en las personas mayores a partir del padrón municipal de los barrios de Cirera, Molins-Torner y Vista Alegre de Mataró y del padrón municipal de Argentona (Barcelona), donde se seleccionó una muestra aleatoria de sujetos mayores de 70 años que vivían en la comunidad. La población registrada en ambos censos municipales era de 30.483 habitantes, de los cuales 2674 (8,8%) eran mayores de 70 años en 2001. Se excluyó del estudio a las personas institucionalizadas y aquellas con una discapacidad física o mental grave que imposibilitase su visita en el centro de atención primaria. Entre mayo de 2002 y junio de 2003 se seleccionó a un total de 824 individuos de ambos sexos, a quienes se mandó una carta informativa invitándoles a participar en el estudio y con quienes posteriormente se estableció contacto telefónico para concertar un día de visita. De los invitados a participar, se excluyeron a 176 (21,3%) porque no cumplían los criterios de

selección y a otros 87 (10,6%) debido a la imposibilidad de establecer contacto con ellos después de al menos tres llamadas telefónicas. De los restantes 561 individuos, 139 (24,8%) no aceptaron participar, 62 (11%) accedieron pero no acudieron a la primera visita y 47 (8,4%) declinaron participar por razones sociales. Finalmente participaron en el estudio 313 ancianos (tasa de respuesta del 55,8%). El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Consorci Sanitari del Maresme. Todos los participantes cumplieron el consentimiento informado antes de su incorporación al estudio (Rueda, Serra-Prat, Fernandez, Palomera, & Puig 2008). Los participantes fueron reevaluados en 2005 y 2010.

De los 313 individuos, 153 eran varones y 160 eran mujeres (tabla 2). La prevalencia de SM según la definición de ATP-III fue del 50,2% y según la definición de la IDF del 57,9%. Al analizar los datos por separado a varones y mujeres, según los criterios de la ATP-III la prevalencia de SM fue del 41,5% en varones y del 58,6% en las mujeres, y según criterios de la IDF, del 54,9% en varones y del 61% en mujeres. Todo ello indica una alta prevalencia de SM en esta población, más marcada en mujeres que en varones (Rueda, Serra-Prat, Fernandez, Palomera, & Puig 2008). La alta prevalencia de SM se debería principalmente al elevado porcentaje de pacientes calificados de hipertensos siguiendo las definiciones empleadas (cerca del 90% tanto en varones como mujeres), y también de obesidad central, sobre todo al utilizar los criterios de la IDF. Adicionalmente, más de un 50% de los participantes presentaban alteraciones de la glucemia. La influencia de la dislipemia es llamativamente baja, siendo el factor que con menor frecuencia se observó en esta población. Llama la atención esta mayor prevalencia de SM en mujeres que hombres, más marcada por criterios de ATP-III, que se explica por el mayor porcentaje de mujeres con obesidad central y HDL bajo en comparación con los varones. La presencia de ECV previa (cardiopatía isquémica y/o accidente vascular cerebral) no fue distinta en relación con la coexistencia o no de SM según los dos criterios, ni ninguno de los componentes del SM se asoció a una mayor prevalencia de ECV. Con estos datos cabe preguntarse si existe una edad a partir de la cual el SM carece de poder como marcador de riesgo CV y si esto es igual para ambos sexos. Por otro lado, alguno de los componentes del SM, como la hipertensión arterial y la obesidad central, son también procesos asociados al fenómeno del envejecimiento, por lo que es difícil determinar si su presencia responde a un fenómeno fisiopatológico común al SM de los pacientes más jóvenes (Rueda, Serra-Prat, Fernandez, Palomera, & Puig 2008).

Tabla 2. Características generales de la población del Estudio de Envejecimiento según sexo. Corresponde a Tabla 1 (Rueda, Serra-Prat, Fernandez, Palomera, & Puig 2008).

	Varones (n=153)	Mujeres (n=160)	p
Edad media (años)	76,7 (5,4)	77,3 (6,4)	0,774
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	27,2 (3,7)	29,0 (4,3)	<0,001
Presión arterial sistólica (mmHg)	141,1 (18,8)	145,0 (23,7)	0,114
Presión arterial diastólica (mmHg)	79,5 (13,1)	81,7 (14,3)	0,142
Colesterol total (mg/dl)	203,9 (37,2)	217,1 (37,3)	0,003
Triglicéridos (mg/dl)	129,0 (84,8)	126,3 (64,3)	0,871
cLDL (mg/dl)	126,5 (33,8)	132,3 (33,6)	0,143
cHDL (mg/dl)	50,9 (10,89)	58,7 (13,2)	<0,001
Glucemia en ayunas (mg/dl)	108,7 (29,3)	105,9 (25,8)	0,336
Perímetro de cintura (cm)	101,8 (11,4)	101,5 (11,1)	0,532
Tabaco			<0,001
Actual	17 (11,3%)	4 (2,6%)	
Previo	109 (72,2%)	5 (3,2%)	
Nunca	25 (16,6%)	146 (94,2%)	
Ingesta alcohol actual (bebe regularmente)	69 (46,6%)	16 (10,7%)	<0,001
Diabetes	30 (19,7%)	35 (22,6%)	0,542
Hipertensión	75 (49,3%)	87 (56,1%)	0,234
Enfermedad coronaria	27 (17,8%)	15 (9,7%)	0,039
Accidente vascular cerebral	17 (11,2%)	21 (13,5%)	0,529
Educación			0,070
Analfabeto	13 (8,6%)	27 (17,4%)	
Sin estudios, pero sabe leer y escribir	57 (37,5%)	61 (39,4%)	
Primarios (ECG o similar)	71 (46,7%)	62 (40,0%)	
Bachillerato	6 (3,9%)	4 (2,6%)	
Universitarios	5 (3,3%)	1 (0,6%)	
Ejercicio físico (horas de caminar/día)	1,6 (1,1)	0,9 (0,8)	<0,001
Estado civil			

Soltero/a	4 (2,6%)	7 (4,5%)	<0,001
Casado/a	124 (81,6%)	72 (46,5%)	
Viudo/a	23 (15,1%)	73 (47,1%)	
Separado/a	1 (0,7%)	3 (1,9%)	
Estado nutricional			0,038
Posible desnutrición	2 (1,4%)	9 (6,2%)	

Los valores se expresan como media (desviación estándar) o número de casos (porcentaje). cHDL: colesterol unido a lipoproteína de alta densidad. cLDL: colesterol unido a lipoproteína de baja densidad. EGB: Educación General Básica.

Uno de los ejes centrales del Estudio de Envejecimiento de Mataró ha sido valorar el papel de la ghrelina en la homeostasis energética de los ancianos (Serra-Prat, Fernandez, Burdoy, Mussoll, Casamitjana, & Puig-Domingo 2007). Se vio que hay una asociación negativa débil entre los niveles de ghrelina y la edad, mostrando que por cada año adicional, la ghrelina desciende unos 11,9 pg/ml. Sin embargo, no había una asociación entre los niveles de ghrelina y el IMC ni marcadores nutricionales como la albúmina o el colesterol total, triglicéridos y LDL, aunque sí con HDL y creatinina. Se vio que los individuos con mayor riesgo de malnutrición por MiniNutritional Assessment-Short Form <12 (MNA-SF <12) tenían unos niveles de ghrelina ligeramente más elevados que los que presentaban un estado nutricional normal. Todo esto sugería que la edad tiene un efecto limitado en los niveles de ghrelina, especialmente entre aquellos individuos no institucionalizados con buena capacidad funcional y estado nutricional. Se vio que los niveles de ghrelina eran superiores en varones que mujeres, tanto a nivel basal como a los 2 años de seguimiento (Serra-Prat, Alfaro, Palomera, Casamitjana, Buquet, Fernandez-Fernandez, & Puig-Domingo 2009a), y que en ambos sexos se producía un descenso significativo de los niveles de ghrelina a los 2 años. También se vio que los niveles de ghrelina eran algo inferiores en los individuos con SM respecto a los que no presentaban SM, y esta diferencia era más evidente a los 2 años de seguimiento. Los niveles bajos de ghrelina se asociaron con un mayor perímetro de cintura y triglicéridos altos, especialmente a expensas de las mujeres, ya que en los varones no se vieron diferencias. Finalmente el número de componentes de SM fue inversamente proporcional a los niveles de ghrelina (Serra-Prat, Alfaro, Palomera, Casamitjana, Buquet, Fernandez-Fernandez, & Puig-Domingo 2009a). Se

correlacionaron los niveles de ghrelina con los de IGF-I tanto en varones como mujeres, pero esta correlación positiva se mostraba en individuos sin SM pero no con los que tenían SM.

Asimismo, no solamente habría un descenso en los niveles de ghrelina con la edad, sino que también se vio que había una alteración en la respuesta de secreción de ghrelina tras la ingesta en los ancianos con una pérdida del ritmo prandial de secreción de la ghrelina en los ancianos frágiles (Serra-Prat, Palomera, Clave, & Puig-Domingo 2009b), lo que podría contribuir a los mecanismos de la anorexia asociada al envejecimiento. Se vio que los ancianos no presentaban la recuperación postprandial de ghrelina en comparación con los jóvenes, y además, los ancianos frágiles no presentaban la supresión postprandial de ghrelina en comparación con los no frágiles y los jóvenes.

También se observó que la pérdida de apetito tenía una alta prevalencia en esta población (un 30%) y que ésta se asociaba a un mayor riesgo de malnutrición, menor fuerza muscular y peor capacidad funcional (Serra-Prat, Fernandez, Burdoy, Mussoll, Casamitjana, & Puig-Domingo 2007) y que la fuerza muscular se asociaba positivamente con el envejecimiento saludable (presente en el 32% de los varones y en el 20% de las mujeres) (Puig-Domingo, Serra-Prat, Merino, Pubill, Burdoy, & Papiol 2008). Asimismo, el estudio longitudinal a dos años vio que la pérdida de peso en los hombres se asociaba a niveles más altos de GH y más bajos de testosterona, mientras que en las mujeres se relacionaba con niveles más bajos de GH (Serra-Prat, Palomera, Roca, & Puig-Domingo 2010). Estas diferencias podrían explicarse por un patrón hormonal y de respuesta al estrés diferente entre ambos sexos, de modo que en hombres, la elevación de la GH sería una respuesta anabólica al proceso catabólico que lleva a la malnutrición, donde además los niveles bajos de testosterona contribuirían a la pérdida de peso. Sin embargo, estos mecanismos no estarían activos en las mujeres, y en ellas los niveles bajos de ghrelina podrían explicar la pérdida de peso y la sarcopenia. La pérdida de fuerza muscular con el seguimiento se asociaba, en los hombres, con la edad, la ghrelina y la testosterona, mientras que en las mujeres se asociaba con SHBG. En los hombres, la ghrelina basal se correlacionó con la fuerza muscular en la mano a nivel basal y a los 2 años de seguimiento, pero esta asociación no se observó en mujeres. También se vio que en la muestra completa, los niveles bajos de ghrelina se asociaban con mayor riesgo de malnutrición (MNA-SF <11 en el seguimiento), en los hombres existió una asociación entre niveles bajos de ghrelina y mayor pérdida de peso y en las mujeres con mayor empeoramiento del estado

nutricional (Serra-Prat, Palomera, Roca, & Puig-Domingo 2010). A pesar de que la ghrelina disminuye globalmente en la muestra, la relación entre la disminución de la ghrelina y el empeoramiento del estado nutricional es diferente entre hombres y mujeres, lo que sugiere que el mecanismo por el que la pérdida de peso lleva a un aumento de la secreción de ghrelina se mantiene preservado en los varones, pero no en las mujeres.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El envejecimiento es un proceso multifactorial y heterogéneo en el que el SM y la obesidad son entidades muy prevalentes. Se desconoce en qué medida la acción de ciertas hormonas que se modifican con la edad, del eje somatotropo y la ghrelina por un lado, el eje corticotropo y la sensibilidad a los GC por el otro, y el eje gonadal, pueden condicionar: 1) la presencia de dicho fenotipo obeso/SM en personas mayores de 70 años, 2) qué relación puedan tener dichos factores para conferir un riesgo CV adicional en población anciana, y 3) cuál pueda ser el papel que pueden jugar en el deterioro de la capacidad funcional en el envejecimiento.

Asimismo, la elevada prevalencia de SM y obesidad que presentan los sujetos ancianos con buena capacidad funcional de ciertas poblaciones podría ser el producto de estilos de vida sedentarizados propios de las sociedades occidentalizadas. Pero este fenómeno ambiental podría tener un efecto diferenciado a nivel individual, que dependería de la diferente agregación genotípica de distintos polimorfismos en los que en su extremo más poco favorable para una senectud robusta nos encontraríamos con aquellos sujetos en los que coincidiera un nivel bajo de IGF-I asociado a la variante polimórfica de 192 pb, el polimorfismo ER22/23EK que conferiría una resistencia relativa a los GC, y finalmente y de forma potencial, ciertos polimorfismos del gen de la ghrelina. Un genotipo en el que coincidieran los polimorfismos desfavorables propiciaría un mayor riesgo de SM y de fragilidad. La prevalencia de los mismos en nuestra población se desconoce, y su asociación con el SM queda por definir.

El presente trabajo doctoral pretende profundizar en esta área de conocimiento estudiando diversos marcadores hormonales y genéticos con el fin de establecer asociaciones con dicho fenotipo de SM/obesidad y de deterioro funcional entre las personas ancianas que viven de forma independiente en la comunidad. Específicamente se pretende explorar la **Hipótesis** de que determinada condición hormonal y la combinación de ciertas variantes alélicas del gen de la ghrelina, del gen de IGF-I y del gen del receptor de GC, se asocian a una mayor prevalencia de SM/obesidad, y asimismo a una menor fuerza muscular, estado mental y peor capacidad física y situación de salud (comorbilidad) en sujetos ancianos.

III. OBJETIVOS

Como **Objetivos Concretos** este trabajo doctoral valorará en la población de sujetos ancianos no institucionalizados, participantes en el Estudio de Envejecimiento de Mataró, y de forma longitudinal, los siguientes factores hormonales y genéticos en relación al SM y fragilidad para establecer potenciales relaciones genotipo /fenotipo:

- 1) Determinar el posible papel de los ejes somatotropo, gonadal y adrenal en la capacidad funcional y el desarrollo de fragilidad en nuestra población de estudio.
- 2) Determinar la frecuencia de los 6 polimorfismos más frecuentes para el gen de ghrelina (-994CTrs26312, -604GA rs27647,- 501AC rs26802, Arg51Gln, Leu72Met y Gln90Leu), la variante alélica de 192 pb del promotor del gen de IGF-I y del polimorfismo ER22/23EK del gen del receptor de GC.
- 3) Evaluar la potencial asociación entre las mencionadas variantes alélicas y la fuerza muscular, capacidad funcional, estado mental y nutricional, y la presencia de los distintos componentes del SM.
- 4) Estudiar el papel de la obestatina en el estado nutricional, hambre, riesgo de SM y deterioro funcional en la muestra poblacional del Estudio de Envejecimiento de Mataró.
- 5) Determinar si alguno de los marcadores metabólicos y hormonales se asocia a una mayor tasa de supervivencia en el estudio longitudinal.

IV. RESULTADOS

Los resultados de los trabajos de esta tesis doctoral están recogidos en los 7 artículos originales descritos a continuación y que constituyen esta sección de la memoria de la tesis:

Original 1:

Mora M, Sánchez L, Serra-Prat M, Palomera E, Blanco J, Aranda G, Falcón I, Cadenas I, Buquet X, Oriola J, Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group.

Hormonal determinants and effect of ER22/23K glucocorticoid receptor gene polymorphism on health status deterioration in the participants of the Mataró Ageing Study.

Age (Dordr). 2012 Jun;34(3):553-61

Factor de impacto: 3.445

Original 2:

Mora M, Perales MJ, Serra-Prat M, Palomera E, Buquet X, Oriola J, Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group.

Aging phenotype and its relationship with IGF-I gene promoter polymorphisms in elderly people living in Catalonia.

Growth Horm IGF Res. 2011 Jun;21(3):174-80.

Factor de impacto: 1.798

Original 3:

Mora M, Adam V, Palomera E, Blesa S, Díaz G, Buquet X, Serra-Prat M, Martín-Escudero JC, Palanca A, Chaves JF, Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group.

Ghrelin gene variants influence on metabolic syndrome components in aged Spanish population.

En revisión mayor por Plos One.

Original 4:

Mora M, Mansego ML, Serra-Prat M, Palomera E, Buquet X, Chaves JF, Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group.

Glucose impairment and ghrelin gene variants are associated to cognitive dysfunction.

Aging Clin Exp Res. 2014 Apr;26(2):161-9.

Factor de impacto: 1.138

Original 5:

Mora M, Granada ML, Roca M, Palomera E, Puig R, Serra-Prat M, Puig-Domingo M.

Obestatin does not modify weight and nutritional behavior but is associated with metabolic syndrome in old women.

Clin Endocrinol (Oxf). 2013 Jun;78(6):882-90.

Factor de impacto: 3.353

Original 6:

Mora M, Granada ML, Palomera E, Serra-Prat M, Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group.

Obestatin is associated to muscle strength, functional capacity and cognitive status in old women.

Age (Dordr). 2013 Dec;35(6):2515-23.

Factor de impacto: 3.445

Original 7:

Mora M, Serra-Prat M, Palomera E, Puig-Domingo M; the Mataró Ageing Study Group.

Metabolic and hormonal contributors to survival in the participants of the Mataró Ageing Study at 8 years follow-up.

Clin Endocrinol (Oxf). 2014 Nov;81(5):775-83.

Factor de impacto: 3.353

En el **original 1** se exponen los resultados relacionados con el **objetivo 1**, en relación al papel de los ejes somatotropo, gonadal y adrenal en la capacidad funcional y desarrollo de fragilidad, así como los resultados relacionados con los **objetivos 2 y 3** en relación al polimorfismo ER22/23EK del gen del receptor de GC (su frecuencia y su asociación con la fuerza muscular, capacidad funcional, estado mental y nutricional, y la presencia de los distintos componentes del SM).

El **original 2** recoge los resultados relacionados con los **objetivos 2 y 3** en relación a la variante alélica de 192 pb del promotor del gen de IGF-I (su frecuencia y su asociación con la fuerza muscular, capacidad funcional, estado mental y nutricional, y la presencia de los distintos componentes del SM).

Los **originales 3 y 4** exponen los resultado relacionados con los **objetivos 2 y 3** en relación a los 6 polimorfismos más frecuentes para el gen de ghrelina (su frecuencia y su asociación con el estado mental y la presencia de los distintos componentes del SM).

El **objetivo 4** que evalúa el papel de la obestatina en el estado nutricional, hambre, riesgo de SM y deterioro funcional está descrito en los **originales 5 y 6**.

El **objetivo 5** sobre el papel de los marcadores metabólicos y hormonales en la supervivencia, se ha estudiado en el **original 7**.

ORIGINAL 1:

Mora M, Sánchez L, Serra-Prat M, Palomera E, Blanco J, Aranda G, Falcón I, Cadenas I, Buquet X, Oriola J, Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group.

Hormonal determinants and effect of ER22/23K glucocorticoid receptor gene polymorphism on health status deterioration in the participants of the Mataró Ageing Study.

Age (Dordr). 2012 Jun;34(3):553-61

Hormonal determinants and effect of ER22/23EK glucocorticoid receptor gene polymorphism on health status deterioration in the participants of the Mataró Ageing Study

Mireia Mora · Lidia Sánchez · Mateu Serra-Prat · Elisabet Palomera · Jesús Blanco · Gloria Aranda · Immaculada Falcón · Immaculada Cadenas · Xavier Boquet · Josep Oriola · Manuel Puig-Domingo · the Mataró Ageing Study Group

Received: 27 December 2010 / Accepted: 17 April 2011
© American Aging Association 2011

Abstract The purpose of this study is to assess the potential relationships of circulating IGF-I, adrenal and gonadal steroids, and polymorphism ER22/23EK of the glucocorticoid receptor (GC-R) gene with nutritional, functional and cognitive deterioration in a group of elderly people living independently. This is a population-based prospective study with 313 individuals (160 women and 153 men, 76.7 ± 7 years) who participated. A physical exam, evaluation of functional capacity (Barthel scale), cognitive function (minimal state examination-MMSE), geriatric depression scale (GDS), mininutritional assessment (MNA-SF) and cardiometabolic status were performed at basal time point and at 2 years of follow-up. Biological measurements included cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulphate, testosterone, estradiol, IGF-I and polymorphism ER22/23EK of the GC-R gene.

Estradiol was associated with MNA-SF decrease over time ($p < 0.01$, adjusted for age and gender, $\beta = -0.17$, $p = 0.03$). Weight loss was related to testosterone in men (8.6 vs 12.1 pg/ml in no losers; $p = 0.03$), and in women with GDS (13.0% with depression vs 3.3% with no depression; $p = 0.05$) and MMSE (22.2% with cognitive deterioration vs 4.8% with no cognitive deterioration; $p = 0.049$). Barthel decrease was associated with testosterone ($p = 0.02$, after adjusting for age and gender, $\beta = -0.520$, $p < 0.001$), and SHBG ($p < 0.01$, adjusted for age and gender, $\beta = 0.18$, $p < 0.01$). DHEA was associated with deterioration in the MMSE ($p = 0.01$, after adjusting for age, gender, GDS scale and academic status, $\beta = -0.26$, $p = 0.01$). Frailty development was related only in men with testosterone levels at the beginning of the study ($p = 0.017$). ER22/23EK was found in 3% of the subjects and carriers had

M. Mora · L. Sánchez · J. Blanco · G. Aranda
Department of Endocrinology and Nutrition,
Hospital Clínic, University of Barcelona,
Barcelona, Spain

M. Serra-Prat · E. Palomera
Research Unit, Consorci Sanitari del Maresme,
Mataró, Barcelona, Spain

I. Falcón
ABS Cirera-Molins, Consorci Sanitari del Maresme,
Mataró, Barcelona, Spain

I. Cadenas
ABS Argentona, Consorci Sanitari del Maresme,
Argentona, Barcelona, Spain

X. Boquet
Department of Biochemistry, Hospital de Mataró,
Mataró, Spain

J. Oriola
Department of Biochemistry and Genetics, Hospital Clínic,
University of Barcelona,
Barcelona, Spain

M. Puig-Domingo (✉)
Department of Endocrinology and Nutrition,
Hospital Germans Trias i Pujol,
Autonomous University of Barcelona,
Carretera de Canyet s/n,
Badalona 08916, Spain
e-mail: mpuigd@gmail.com

a lower prevalence of hypertension. Adrenal and gonadal steroids are associated to impairment of the ageing health condition in elderly individuals living independently in Spain. ER22/23EK polymorphism of the GC-R gene has a low prevalence in our population.

Keywords Ageing · Steroidal hormones · Frailty · Functional capacity · Nutritional status · Cognitive function · Depression

Introduction

Among healthy elderly individuals there is a considerable variation in the effects of age on physiological functions, with some people showing an important and accelerated decline whilst others exhibit a high resistance to this process. The continuous decline of certain hormonal systems throughout the lifespan has been related to the loss of function that characterizes the ageing process; in particular, diminution of adrenal steroids, specifically dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulphate (DHEAs)/cortisol ratios, circulating sexual steroids and GH, have been claimed to be associated with poor cognitive status, depression and decreased functional performance in elderly people (Wolf 2003; Barrett-Connor et al. 1999a; Cappola et al. 2001). However, heterogeneous results have been reported by different studies (De Bruin et al. 2002; Janssen et al. 1998) leading difficult understanding of the ageing process and its associated diseases in relation to the endocrine system. Furthermore, the associated diseases of the elderly and their treatments do not facilitate how to define the frontier between physiology and pathophysiology whilst ageing, and can themselves influence hormonal status (Lamberts et al. 1997). Moreover, normative hormonal data in elderly people are just beginning to become available (Mohr et al. 2005) and the diagnosis and treatment of certain endocrine defects in aged people are still a matter of debate, i.e. late-onset male hypogonadism (Nieschlag et al. 2005). Also, some gene polymorphisms involving hormonal action, such as the ER22/23EK (rs6189 and rs6190) of the glucocorticoid receptor (GC-R) gene have been linked to a particular protective situation in elders, related to a less pronounced cortisol effect on target tissues (Van

Rossum and Lamberts 2004; Van Rossum et al. 2004; Van Rossum et al. 2005).

This paper reports the results of the Mataró Ageing Study in which a cohort of 313 old people have been enrolled and followed for 2 years. Investigations were carried out to clarify the potential relationship between sexual, adrenal and somatotrophic hormones and ER22/23EK polymorphic variant of the GC-R gene and the development of impaired health condition in this cohort.

Subjects and methods

Individuals of both sexes, aged more than 70 years, living in the neighbourhood of Cirera-Molins in Mataró and the nearby village of Argentona, north of Barcelona, were invited to participate in this longitudinal study aiming to identify factors influencing a frail or robust condition whilst ageing. The recruitment phase was performed between May 2002 and June 2003, and participants were re-evaluated in 2005. The initial cohort included 313 individuals (160 women and 153 men; mean age was 76.7 ± 7 years for the total group, with no differences between sexes) and was evaluated at the basal time point and after a follow-up of 2 years. The general characteristics of the participants have been described elsewhere (Puig-Domingo et al. 2008). Cardiovascular risk factors were highly prevalent in both women and men and most of them were taking medication for these conditions (Puig-Domingo et al. 2008); however, none of these treatments influenced the relationships described in this paper. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Mataró.

Measurements

Hormonal measurements

Blood samples were drawn in the morning after overnight fasting. Hormonal measurements were performed by commercial validated kits with low CVs, and included: free testosterone (men, 9–41 pg/ml; women, 0.2–3.2 pg/ml. pg/ml; Immunotech, Marseille Cedex, France), estrone (men, 30–90 pg/ml; women, 20–40 pg/ml; DSL, Webster, Texas, USA), dehydroepian-

drosterone (DHEA; men, 1.51–9.0 ng/ml; women, 0.7–2.1 ng/ml; Immunotech, Marseille Cedex, France) and DHEA sulphate (DHEAs; men, 50–560 mcg/dl; women, 35–430 mcg/dl; Immunotech, Marseille Cedex, France), IGF-1 (men, 49–250 ng/ml; women, 49–250 ng/ml; Nichols Institute, San Clemente, CA, USA); estradiol (pg/ml), LH (men, 2.0–12.0 mUI/ml; women, 10.0–62.0 mUI/ml) and FSH (men, 2.0–12.0 mUI/ml; women, 5.0–60.0 mUI/ml; Advia Centaur, Bayer Diagnostics, Spain), cortisol (5.0–25.0 mcg/dl) and GH (0.1–5 ng/ml; Immulite 2000, Dipesa, Spain).

ER22/23EK polymorphism of the glucocorticoid receptor gene

Genomic DNA was extracted from blood samples as the serum for the hormonal studies according to standard procedures; sample availability for genotyping was possible in 309 out of 313 individuals. Genotypes were determined using the Taqman allelic discrimination assay. The Assay-by-Design service (<http://www.appliedbio-systems.com>) was used to set up a Taqman allelic discrimination assay for ER22/23EK. Primer and probe sequences are available on request. To confirm the accuracy of genotyping results, 80 randomly selected samples were re-genotyped using the same method and showed similar results. The polymerase chain reaction (PCR) mixture included 20 ng of genomic DNA in a 25 µl volume and the following reagents: FAM and VIC probes (250 nM), primers (900 nM), 2× Taqman PCR master mix (ABgene). PCR cycling reactions were performed in 96-well PCR plates in an ABI 7900 PCR system (Applied Biosystems Inc) and consisted of initial denaturation for 15 min at 95°C, 40 cycles with denaturation for 15 s at 95°C, and annealing and extension for 60 s at 60°C. The results were analyzed using the sequence detection system 2.3 software (Applied Biosystems Inc.).

Functional capacity and nutritional status

Functional capacity was assessed by calculation of Barthel (Mahoney and Barthel 1965) and Lawton scores (Lawton and Brody 1969). Nutritional status evaluated by performing the reduced form of Mini Nutritional Assessment test (MNA-SF; Rubenstein et al. 2001).

Mental status and depression

Mental status was measured by the Mini Mental State Examination (MMSE; Folstein et al. 1975) and depressive status by performing the Geriatric Depression Scale (GDS; Hoyl et al. 1999).

Evaluation of frailty

Frailty was evaluated by using Fried criteria (Fried et al. 2001).

Metabolic syndrome (MS) definition

The International Diabetes Federation (IDF) definition of metabolic syndrome (MS; Alberti et al. 2006) was used, in which individuals were classified as having MS if the waist perimeter was >94 cm in men or >80 cm in women plus two or more of the following: (1) arterial blood pressure >130/85 mmHg or antihypertensive treatment, (2) triglycerides >150 mg/dl or use of treatment for hypertriglyceridemia, (3) high density lipoprotein (HDL) ≤40 mg/dl in men or ≤50 mg/dl in women or (4) fasting glucose ≥100 mg/dl or diabetes.

Data analysis

Statistical descriptive analyses were performed expressing categorical data as percentages and continuous data as means and standard deviations. Analyses were performed for the whole cohort or separately for men and women when required. To compare proportions by gender or other categorical variables a chi square test or a Fisher's exact test was used. The correlations between hormone concentrations, mental and depressive status, and functional capacity measurements were done using the Spearman correlation coefficient (r_s). For further study of the relationship between these variables, an initial univariate analysis was carried out by using a linear regression. A multivariate regression analysis was additionally performed to adjust the effects of the variables showing an association in the univariate analysis with mental status, depressive state, MNA-SF or functional capacity with a p value <0.20. Statistical significance was considered when the p value was <0.05.

Results

Phenotype description and hormones concentrations at basal time point

Descriptive data of the physical characteristics, as well as age, BMI and abdominal perimeter, MMSE, MNA-SF, GDS, Barthel and Lawton scores are shown in Table 1. Globally, men performed better than women in most of the parameters evaluated indicating a much better ageing condition in men. Metabolic syndrome according to IDF criteria was present in 57.9% of the cohort (54.9% in men and 61% in women). Both males and females showed a high prevalence of obesity, as mean BMI was above normal in either sex, and a prevalence of 30% of obesity was found for the total sample. This tendency to obesity was paralleled by elevated abdominal perimeter, with no differences in absolute values in relation to gender. Only 3/110 obese individuals showed obesity with a healthy metabolic profile (no hypertension, no hypertriglyceridemia, no low HDL, no abnormal glucose values). Twenty-four subjects died during the follow-up period of 2 years, 14 (9.2%) men and 10 (6.2%) women.

In women, DHEA and DHEAs showed a decrease with age ($r_s = -0.17$, $p = 0.04$ and $r_s = -0.16$, $p < 0.05$, respectively), while testosterone, estradiol and estrone, IGF-I, IGFBP-3 and IGF-I/IGFBP3 ratio did not show changes in the age range studied (71–102 year old). In men, a decrease with age was only observed in testosterone ($r_s = -0.19$, $p = 0.02$) with no changes in the rest of hormones.

Estrogens were higher in men than in women, either estradiol (48.7 ± 14.7 pg/mL vs 32.1 ± 12.7 pg/mL, $p < 0.05$) and estrone (42.9 ± 21.4 pg/mL vs $27.9 \pm$

16.1 pg/mL, $p = 0.049$). Testosterone showed a positive correlation with estradiol in men but not in women ($\beta = 0.33$, $p < 0.001$) and IGF-I did correlate with IGFBP-3 in both genders.

Relationships of hormones with cognition, depressive status, functional capacity and nutritional assessment at basal time point

No relationship was observed in men with any of the steroids and other hormones studied with cognition and mood at basal time point, while cognitive function in women showed a negative correlation with DHEA ($\beta = -0.79$, $p = 0.03$), cortisol ($\beta = -0.27$; $p < 0.01$) and a positive correlation with IGF-I ($\beta = 0.03$, $p = 0.04$), as well as higher education ($\beta = 3.40$, $p < 0.001$) after adjustment for depressive status (GDS score); higher education also correlated with cognitive function in men. These results in women were also observed when the memory items of the MMSE were separately analyzed, with persistence of the negative correlation of DHEA, although the positive correlation of IGF-I and the negative correlation of cortisol lost statistical significance. When a multivariate logistic regression analysis was performed the higher education showed the maximal protective effect (OR = 6.25, $p < 0.001$) for preserved cognitive status in both genders; in women, OR for deteriorated cognition for age, DHEA and cortisol were 1.14 ($p < 0.001$), 1.57 ($p = 0.02$) and 1.09 ($p = 0.02$), respectively. No correlations were observed between DHEAs and any of the variables evaluated. Furthermore, no association with depression and any of the other hormones studied were found in either men or women.

The results of the multivariate analysis showed that Barthel was related to age ($\beta = -0.18$, $p < 0.01$), gender ($\beta = -0.26$, $p = 0.04$) and IGF-I ($\beta = 0.12$,

Table 1 Descriptive data of the study sample

	Men ($n = 153$)	Women ($n = 160$)	p value
Age	76.7 ± 5.4	77.3 ± 6.4	n.s.
BMI	27.2 ± 3.7	29.2 ± 4.8	< 0.001
Abdomen perimeter	101.8 ± 11.4	101.5 ± 11.1	n.s.
MMSE	30.0 ± 4.9	27.8 ± 6.5	0.002
Lawton	5.5 ± 2.0	6.9 ± 1.8	< 0.001
Barthel	97.4 ± 6.0	94.8 ± 9.2	0.005
Depression score	29/138 (20%)	71/146 (48.6%)	< 0.001
MNA-SF	14.1 ± 1.4	13.4 ± 2.0	0.001

ns $p \geq 0.05$, *BMI* body mass index, *MMSE* mini-mental state examination, *MNA-SF* Mini Nutritional Assessment

$p=0.04$) with no significant influence of steroid hormones; MNA-SF was associated to GDS (beta=-0.22, $p<0.001$), cortisol (beta=-0.18, $p<0.01$) and DHEA (beta=0.15, $p=0.03$); MMSE was related to age (beta=-0.24, $p<0.001$), academic status (beta=0.42, $p<0.001$) and DHEA (beta=-0.16, $p<0.01$); GDS was associated to gender (beta=0.26, $p=0.03$), estradiol (beta=0.15, $p=0.04$) and DHEAs (beta=-0.14 and $p=0.06$).

Evolution of MNA, MMSE, functional capacity and GDS

According to the MNA, only 1.4% of men and 6.2% of women were at risk of malnutrition ($p=0.06$) at basal time point. During the follow-up period, 13% of men and 20% of women showed a >5% weight loss, and nutritional status according to MNA-SF categories deteriorated in 18% of men and 39% of women. In both men and women, the reduction of the MNA-SF score during the follow-up period was statistically significant with a decrease of 1.53 points in men and 1.72 points in women. In men, >5% weight loss was related with age (9.6% in 70- to 80-year-old group vs 22.9% in the >80-year-old group; $p=0.06$) but not with any of the co-morbidities considered except possible depression (GDS \geq 2; 10.0% with no depression vs 26.9% with possible depression; $p=0.03$). Women showed a more pronounced decline in nutritional status over the 2-year follow-up period in comparison to men. In women, >5% weight loss was not related with any of the variables considered and >10% weight loss was related with GDS (13.0% if possible depression vs 3.3% if no depression; $p=0.05$) and MMSE (22.2% if cognitive deterioration vs 4.8% if no cognitive deterioration; $p=0.049$).

According to MMSE, at basal time point, 22 women (15.3%) and 10 men (7.3%) had moderate impairment in cognitive status, 14 women (9.7%) and 9 men (6.6%) had mild impairment and the rest had a normal cognitive function (108 women, 75%; 118 men, 86%). MMSE results showed a negative correlation with age ($r_s=-0.27$, $p<0.001$). At 2-years follow-up in 235 out of 285 who were still alive, 9 women (7.3%) and 4 men (3.6%) showed severe impairment in cognitive status, 12 women (9.7%) and 4 men (3.6%) moderate impairment, 16 women (12.9%) and 8 men (7.2%) mild impairment and the rest had normal cognitive function (87 women, 70.2%; 95 men, 85.6%).

A notable difference in depressive status was found according to gender after GDS evaluation, as 71 out of 146 women showed depressive scores (48.6%) in comparison to 29 out of 138 men (21%); there were no changes in GDS scores with older ages. At 2-years follow-up, GDS scores showed 47 out of 124 women (37.4%) in comparison 13 out of 111 men (11.7%).

Barthel score was optimal in 172 out of 300 individuals (57.3%), 66 out of 152 women (43.4%) and 106 out of 148 men (71.6%). Physical activity, measured as outdoor self-reported walking hours per day, was 0.87 h/day in women and 1.56 h/day in men (median, $p<0.001$). During the follow-up period, the Barthel score improved in 8.8%, did not change in 63.4% and worsened in 27.8% of participants (25.2% worsened from 5 to 19 points and 2.6% worsened 20 points or more). The decline of Barthel score was correlated with MNA-SF ($r=-0.18$; $p<0.01$) in the whole cohort and was also related to age, as individuals with a Barthel loss >10% had a median age of 80.3 years and used to walk outdoors 0.64 h a day in comparison to 76.3 years old and 1.21 h a day in <10% Barthel loss ($p<0.01$ and $p=0.02$, respectively).

Relationships between hormone levels and changes in nutritional status, functional capacity, MMSE and GDS at 2-years follow-up

When we evaluated the association between the hormonal profile at basal time point and the changes observed at follow-up in MNA-SF, Barthel, GDS and MMSE scales, a significant association was found with estradiol and the difference in MNA-SF value for the whole cohort ($p<0.01$, after adjusting for age and gender, beta=-0.17, $p=0.03$). Men with >5% weight loss had lower median basal testosterone (8.57 pg/ml vs 12.14 pg/ml in no losers; $p=0.03$). In women, weight loss was not related to basal hormonal levels. The change in Barthel scale was significantly associated with testosterone ($p=0.02$, after adjusting for age and gender, beta=-0.52, $p<0.001$), and SHBG ($p<0.01$, after adjusting for age and gender, beta=0.18, $p<0.01$). DHEA was associated with the change in MMSE ($p=0.01$, after adjusting for age, gender, GDS scale and academic status, beta=-0.26, $p=0.01$). Results are shown in Table 2.

Table 2 Relationships between hormone levels and changes in nutritional status, functional capacity, MMSE and GDS at 2-years follow-up

	Whole cohort			Men		Women	
	Crude analysis	After adjusting		Crude analysis	After adjusting	Crude analysis	After adjusting
	Difference in MNA	$p=0.009$	beta=-0.173; $p=0.031^a$		ns	-	$p=0.013$
Difference in Barthel	$p=0.021$	beta=-0.520; $p=0.000^a$		$p=0.001$	beta=-0.308; $p=0.002^b$	ns	-
Difference in MMSE	$p=0.002$	beta=0.185; $p=0.007^a$		$p=0.022$	beta=0.208; $p=0.037^b$	$p=0.022$	beta=0.190; $p=0.042^b$
	ns	-		$p=0.036$	beta=-0.238; $p=0.028^c$	ns	-
	$p=0.014$	beta=-0.257; $p=0.011^d$		ns	-	$p=0.009$	beta=-0.258; $p=0.011^c$

MNA Mini Nutritional Assessment, MMSE mini-mental state examination.

^a After adjusting for age and gender.

^b After adjusting for age.

^c After adjusting for age, GDS scale and academic status.

^d After adjusting for age, gender, GDS scale and academic status.

Frailty at basal time and follow-up and its relationship to hormone levels

According to Fried criteria, 4.6% of individuals (14 out of 304; 4/151 men and 10/153 women) were frail at basal time point. Frailty was associated to IGF-I levels (96.3 ± 14.9 mcg/dl in frail individuals vs 103.3 ± 36.9 mcg/dl in non-frail individuals, $p=0.02$; after adjusting for age and gender $p=0.45$) and a trend between frailty and DHEAs was also found (28.8 ± 26.3 mcg/dl in frail individuals vs 49.4 ± 41.8 mcg/dl in non-frail individuals, $p=0.09$, after adjusting for age and gender $p=0.29$).

At 2-years follow-up, 31.4% of individuals were frail (83 out of 264 in which follow-up was possible and frailty criteria were available; 26/131 men and 57/133 women) and 77 out of 258 (29.8%) became frail at 2-years follow-up. The change from non-frail to frail was associated to lower levels of testosterone at the beginning of the study ($p<0.001$), estradiol ($p<0.01$), IGF-I ($p=0.09$) and SHBG ($p=0.06$). When categorizing by gender, a significant association with frailty development was observed only in men with testosterone levels at the beginning of the study (10.7 ± 4.3 vs 13.0 ± 4.2 pg/ml, $p=0.02$; which remained significant after adjusting for age, $p=0.02$). A trend was also observed in men for DHEA and estradiol ($p=0.08$ for both). In women, no associations were found with hormone levels and frailty development.

ER22/23EK polymorphism of the GC-R gene and cardiometabolic status

The ER22/23EK polymorphism of the GC-R gene was found in 8/309 (2.5%) of the total population (four women and four men). No differences in anthropometric variables, including waist circumference and lipid profile were found in relation to this polymorphism; abnormal glycaemia was found in 51.9% of non-carriers vs 42.9% of carriers ($p=0.71$); a blood pressure $>130/85$ was found in 88% of non-carriers vs 62.5% of carriers ($p=0.05$); metabolic syndrome (IDF criteria) was found in 58% of non-carriers and in 28.6% of carriers ($p=0.14$). Barthel and MNA scores were not different among carriers and non-carriers; in the heterozygous carriers of ER22/23EK, cortisol was lower (15.4 ± 4.9 vs 18.4 ± 6.8 g/dl) as well as DHEAs (28.1 ± 15.0 vs 48.4 ± 23.0 g/dl), although without reaching statistical

significance ($p=0.20$ and 0.17 , respectively). Carriers of this polymorphism showed similar levels of cognitive status and mood as non-carriers in our cohort. No changes at 2 year of follow-up were found in relation to this polymorphism with the changes in functional capacity, MNA, MMSE and GDS.

Discussion

In this population of independently living old men and women, we found an expected decline in global mental function and certain hormones with age. IGF-I did not show changes in the range of age of our cohort, probably indicating that no further decline in the circulating levels of IGF-I may be expected to happen over 75 years of age when a sample of population is studied, although on an individual basis some decline may be possible. A considerable percentage of women, about half of the sample in our cohort—the double of men—showed a depressive mood score with no remarkable changes in relation to age. Also, a similar situation was seen in relation to cognition with more women showing cognitive dysfunction in either category explored (global and memory items of the MMSE) in comparison to men. The endocrine system may influence the dynamics of ageing, and reciprocally, changes in the synthesis and metabolism of different families of hormones are determined and timed by age (Lamberts et al. 1997). In our study, it was also shown that estrogens exposure is higher in old men than in old women, because of the continuous conversion of testosterone to estrogens takes place in peripheral tissues, explaining why testosterone and estradiol depicted a high positive correlation in men. Therefore, overall, men have a more prolonged gonadal hormonal exposure during life than women. This point may have implications for physical, mental and mood performance when comparisons between genders are considered, and mostly in terms of frailty development or robust condition during ageing. Taken overall, our results seem to indicate a protective effect of gonadal steroids in both genders in relation to nutritional, functional, cognitive and mood which decline over time. Individuals with higher IGF-I also performed better than those in the lower range. DHEA and its sulphate remains the main gonadal prohormone in women, with the potential of being converted subse-

quently to either androgens or estrogens, but always at a considerably lower absolute value than those observed in men. DHEA has been related to mood status in women of the Rancho Bernardo Study (Barrett-Connor et al. 1999b; Barrett-Connor et al. 1999c) and an interesting debate has been running over the last decade in relation to the possible beneficial effects of DHEA supplementation in old women with the aim of achieving circulating levels in the range of younger women. Up to now, no consistent results have been obtained that justify long-term supplementation with this steroid in the general population of old women (Gurnell and Chatterjee 2001; Nair et al. 2006) and it is currently just recommended as substitution treatment for young women with primary adrenal insufficiency, where an improvement in self esteem, mood and general well-being have been described using this treatment (Hunt et al. 2000). Despite this lack of a formal recommendation, DHEA is available and used in some countries without medical prescription. Our results seem to indicate that DHEA is rather protective for the whole cohort, and particularly in women, as at a 2-year follow-up, women with a lower DHEA had a more global cognitive impairment and also a lower memory performance. Other studies have also tried to evaluate the relationship between adrenal steroids and cognition in women, and in some of them overexposure to cortisol has been associated to cognitive impairment (Lupien et al. 1997; Seeman et al. 1994), and in others, i.e. Kalmijn et al. (Kalmijn et al. 1998), a relationship with mental impairment was found with the cortisol/DHEAs ratio rather than with cortisol or DHEAs individually, by virtue of which a higher ratio was associated to an impaired cognitive performance. DHEA itself has been proposed as a neuroprotective steroid, but most of the information has been obtained in experimental models in which DHEA seems to act as a natural counteractive factor of cortisol, the latter being believed to have increasing neurotoxic actions when DHEA is decreasing as a consequence of ageing at the hippocampus and other important sites of the central nervous system (Bologna et al. 1987; Sapolsky et al. 1990). We did not find any relationship between cortisol/DHEA ratio and cognitive or memory performance in our cohort of women. More than cortisol, or the cortisol/DHEAs ratio, a relevant factor may be the individual sensitivity or resistance to circulating cortisol according to some polymor-

phisms of the glucocorticoid receptor gene, as previously described in the cohort of the Rotterdam study (Van Rossum and Lamberts 2004; Van Rossum et al. 2004; Van Rossum et al. 2005). In our study, due to the an unexpected low prevalence of ER22/23EK polymorphism of the GC-R gene in comparison to the Rotterdam study (2% vs 8%), we were underpowered to show any relationship with certain variables, although our carriers had less frequency of hypertension, agreeing with previous publications of the Rotterdam study.

Also remarkable in our study is that testosterone showed a cognitive protective effect in men, thus indicating that hormonal status was important in our cohort for development of frailty, as MNA and weight loss were also associated to testosterone. The most prominent factor associated to a good cognitive status were age itself and higher education, the latter having a greater influence than any other biological factors considered. Therefore, although the hormonal changes seen in ageing may be of some importance, non-hormonal factors are important driving factors determining the cognitive status of old persons.

Somatotropic axis activity was also weakly associated to better cognitive scores in women, a fact that has also been reported in other studies in men (Aleman et al. 1999); this may be due to some neuroprotective actions of GH and IGF-I. In old men, substitutive treatment with GH and/or testosterone has shown contradictory results in mood changes (Barrett-Connor et al. 1999a; Tenofer 1992; Wang et al. 1996; Brill et al. 2002). In our cohort, men seemed to be overall exposed to more factors associated to better psychophysical condition, with a better academic background, more hours per day of exercise, and higher levels of somatotrophic axis activity and sexual hormones but significant statistical associations were not found.

We did not find any relationship between depressive status and adrenal or sexual steroids in men and women when analyzed separately; although double the number of women in relation to men had depressive scores and all gonadal hormones were much higher in men, it is difficult to elucidate whether these gender differences of elderly mood may be influenced by these different hormonal profiles. A lack of statistical power of our study may explain our results, as other studies with more individuals have shown a positive relationship of

testosterone and less depression in men (Barrett-Connor et al. 1999c).

In relation to frailty status in men, frailty development has been associated to lower levels of testosterone. However, we found no association between frailty development in women and hormonal status. These results are probably explained by a greater and longer hormonal exposure in men than in women, who present globally lower adrenal and gonadal steroids in comparison to men. So, differences in men in frailty development may be explained partially by hormonal status while in women other non-hormonal factors may contribute to frailty.

In conclusion, our study indicates that in a population of old people living independently, gonadotropic, somatotrophic and adrenal axis may participate, to some extent, to the development of impairment of health status that characterizes the ageing condition, and particularly in women.

Acknowledgements We thank Cristina Mas for technical assistance.

Special thanks to Nicola Van Berckel for reviewing the English version of the manuscript.

This work was supported by grants from the Catalan Agency for health and Technology Assessment #095/16/02; iMSERSO #E094 and E88/03 and Fis #PIO 070601.

References

- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J (2006) Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 23:469–480
- Aleman A, Verhaar HJ, de Haan EH, de Vries WR, Samson MM, Drent ML, van der Veen EA, Koppeschaar HP (1999) Insulin-like growth factor-I and cognitive function in healthy older men. *J Clin Endocrinol Metab* 84:471–475
- Barrett-Connor E, Von Mühlen DG, Kritiz-Silverstein D (1999a) Bioavailable testosterone and depressed mood in older men: The Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 84:573–577
- Barrett-Connor E, von Muhlen D, Laughlin GA, Kripke A (1999b) Endogenous levels of dehydroepiandrosterone sulfate, but not other sex hormones, are associated with depressed mood in older women: the Rancho Bernardo Study. *J Am Geriatr Soc* 47:685–691
- Barrett-Connor E, von Mühlen DG, Kritiz-Silverstein D (1999c) Bioavailable testosterone and depressed mood in older men: The Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2573–2577
- Bologna L, Sharma J, Roberts E (1987) Dehydroepiandrosterone, and its sulfated derivative reduce neuronal death and enhance astrocytic differentiation in brain cell cultures. *J Neurosci Res* 17:225–234

- Brill KT, Weltman AL, Gentili A, Patrie JT, Fryburg DA, Hanks JB, Urban RJ, Veldhuis JD (2002) Single and combined effects of growth hormone and testosterone administration on measures of body composition, physical performance, mood, sexual function, bone turnover, and muscle gene expression in healthy older men. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5649–5657
- Cappola AR, Bandeen-Roche K, Wand GS, Volpato S, Fried LP (2001) Association of IGF-I levels with muscle strength and mobility in older women. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4139–4146
- De Bruin VM, Vieira MC, Rocha MN, Viana GS (2002) Cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate plasma levels and their relationship to aging, cognitive function and dementia. *Brain Cogn* 50:316–323
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) Mini Mental State: a practical method for grading the cognitive state patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189–198
- Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J ST, Tracy R, Kop WJ, Burke G, McBurnie MA, Cardiovascular Health Study Collaborative Research G (2001) Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:M146–M156
- Gurnell EM, Chatterjee VK (2001) Dehydroepiandrosterone replacement therapy. *Eur J Endocrinol* 145:103–106
- Hoyle MT, Alessi CA, Harker JO, Josephson KR, Pietruszka FM, Koelgen M, Mervis JR, Fitten LJ, Rubenstein LZ (1999) Development and testing of a five-item version of the Geriatric Depression Scale. *J Am Geriatr Soc* 47(7):873–878
- Hunt PJ, Gurnell EM, Huppert FA, Richards C, Prevost AT, Wass JA, Herbert J, Chatterjee VK (2000) Improvement in mood and fatigue after dehydroepiandrosterone replacement in Addison's disease in a randomised, double blind trial. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4650–4656
- Janssen JA, Stolk RP, Pols HA, Grobbee DE, de Jong FH, Lamberts SW (1998) Serum free IGF-I, total IGF-I, IGFBP-1 and IGFBP-3 levels in an elderly population: relation to age and sex steroids levels. *Clin Endocrinol* 48:471–478
- Kalminj S, Launer LJ, Stolk RP, de Jong FH, Pols HA, Hofman A, Breteler MM, Lamberts SW (1998) A prospective study on cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate, and cognitive function in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3487–3492
- Lamberts SWJ, van den Beld AW, van der Lely AJ (1997) The endocrinology of aging. *Science* 278:419–424
- Lawton MP, Brody E (1969) Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist* 9:179–186
- Lupien SJ, Gaudreau S, Tchiteya BM, Maheu F, Sharma S, Nair NP, Hauger RL, McEwen BS, Meaney MJ (1997) Stress-induced declarative memory impairment in healthy elderly subjects: relationship to cortisol reactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2070–2075
- Mahoney FI, Barthel DW (1965) Functional evaluation: The Barthel Index. *Md State Med J* 14:61–65
- Mohr BA, Guay AT, O'Donnell AB, McKinley JB (2005) Normal, bound and nonbound testosterone levels in normally ageing men: results from the Massachusetts Male Ageing Study. *Clin Endocrinol* 62:64–73
- Nair KS, Rizza RA, O'Brien P, Dhatariya K, Short KR, Nehra A, Vittone JL, Klee GG, Basu A, Basu R, Cobelli C, Toffolo G, Dalla Man C, Tindall DJ, Melton LJ 3rd, Smith GE, Khosla S, Jensen MD (2006) DHEA in elderly women and DHEA or testosterone in elderly men. *N Engl J Med* 355:1647–1659
- Nieschlag E, Swerdloff R, Berhe HM, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, Lunenfeld B, Morley JE, Schulman C, Wang C, Weidner W, Wu FC (2005) Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, and EAU recommendations. *J Androl* 28:125–127
- Puig-Domingo M, Serra-Prat M, Merino MJ, Pubill M, Burdoy E, Papiol M (2008) Muscle strength in the Mataró aging study participants and its relationship to successful aging. *Aging Clin Exp Res* 20(5):439–446
- Rubenstein LZ, Harker JO, Salva A, Guigoz Y, Vellas B (2001) Screening for undernutrition in geriatric practice: developing the short-form mini-nutritional assessment (MNA-SF). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56(6):M366–M372
- Sapolyk RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE (1990) Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci* 10:2897–2902
- Seeman TE, McEwen BS, Singer BH, Albert MS, Rowe JW (1994) Increase in urinary cortisol excretion and memory declines: McArthur studies on successful aging. *J Neurosci* 14:2893–2903
- Tenofer JC (1992) Effects of testosterone supplementation in the aging male. *J Clin Endocrinol Metab* 75:1092–1098
- Van Rossum EF, Lamberts SW (2004) Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res* 59:333–357
- Van Rossum EF, Feelders RA, Van den Beld AW, Uitterlinden AG, Janssen JA, Ester W, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, Pols HA, Koper JW, Lamberts SW (2004) Association of the ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene with survival and C-reactive protein levels in elderly men. *Am J Med* 117:158–162
- Van Rossum EF, Russcher H, Lamberts SW (2005) Genetic polymorphisms and multifactorial diseases: facts and fallacies revealed by the glucocorticoid receptor gene. *Trends Endocrinol Metab* 16:445–450
- Wang C, Eyre DR, Clark R, Kleinberg D, Newman C, Iranmanesh A, Veldhuis J, Dudley RE, Berman N, Davidson T, Barstow TJ, Sinow R, Alexander G, Swerdloff RS (1996) Sublingual testosterone replacement improves muscle mass and strength, decreases bone resorption and increases bone formation markers in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3654–3662
- Wolf OT (2003) Cognitive functions and sex steroids. *Ann Endocrinol* 64:158–161

ORIGINAL 2:

Mora M, Perales MJ, Serra-Prat M, Palomera E, Buquet X, Oriola J, Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group.

Ageing phenotype and its relationship with IGF-I gene promoter polymorphisms in elderly people living in Catalonia.

Growth Horm IGF Res. 2011 Jun;21(3):174-80.



Contents lists available at ScienceDirect

Growth Hormone & IGF Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ghir

Aging phenotype and its relationship with IGF-I gene promoter polymorphisms in elderly people living in Catalonia

Mireia Mora ^a, María José Perales ^b, Mateu Serra-Prat ^c, Elisabet Palomera ^c, Xavier Buquet ^d, Josep Oriola ^b, Manel Puig-Domingo ^{a,e,*}
and The Mataró Ageing Study Group ¹

^a Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clínic i Universitari of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Department of Biochemistry and Molecular Genetics Service, Hospital Clínic i Universitari of Barcelona, Barcelona, Spain

^c Research Unit and Ciberhep, Hospital de Mataró, Mataró, Spain

^d Biochemistry Service, Hospital de Mataró, Mataró, Spain

^e Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 October 2010

Received in revised form 8 March 2011

Accepted 27 March 2011

Keywords:

Ageing

IGF-I

Promoter region polymorphisms

Metabolic syndrome

ABSTRACT

Objectives: Genetic variations in the Insulin/IGF-I genes pathway have been related to longevity, dementia, metabolic diseases and cancer. The purpose of the present study was to investigate the 192 bp allele of IGF-I gene promoter and its relationship with metabolic syndrome (MS) components, mental and nutritional state, muscle strength and functional capacity in an aged Spanish population.

Design: Population-based study (Mataró Ageing Study), including 292 subjects (144 men and 148 women, mean age 77.0 ± 5.4). Anthropometric variables, lipid profile, glucose and blood pressure (BP) were measured; mental state (MMSE), nutritional state (MNA) and Barthel scale were performed, and were correlated to the presence of the 192 bp allele of IGF-1 gene promoter polymorphisms.

Results: MS (ATP-III criteria) was found in 49.5% (41.4% in men and 57.6% in women). The 192 bp allele of IGF-I gene promoter was distributed as: 41.9% homozygous, 44.3% heterozygous and 13.9% were non-carriers of this allele. A lower prevalence of metabolic syndrome was observed in homozygous (41.9% vs 54.9% in heterozygous + non-carriers, $p = 0.031$). Mental state (MMSE), nutritional state (MNA) and Barthel scale were better in homozygous individuals compared to heterozygous and non-carriers ($p = 0.015$, $p = 0.026$ and 0.047 , respectively). In men, MNA was better in homozygous with no differences in MMSE and Barthel scales. In homozygous women, BP was lower ($p = 0.009$) and Barthel scale was better ($p = 0.05$) with no differences in MMSE and MNA.

Conclusion: Homozygosity for the 192 bp allele of the IGF-I gene polymorphism suggests a healthier aging condition, with less prevalence of cardiometabolic disturbances, and better mental, nutritional and functional state.

© 2011 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) is a peptide mainly synthesized by the liver which stimulates skeletal growth, cell differentiation and metabolism. It influences body composition and its secretion is regulated by growth hormone (GH), nutritional status, liver function, insulin and other hormones [1]. Moreover, IGF-I is involved in regulating the function, maintenance and repair of many tissues [2].

* Corresponding author at: Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Autonomous University of Barcelona, Spain. Tel.: +34 934978860.

E-mail address: mpuigd@gmail.com (M. Puig-Domingo).

¹ The Mataró Ageing Study Group: Ayllón J, Buquet X, Bosch A, Burdoy E, Cadenas I, Dordas J, Espinosa C, Falcón I, Gordillo M, Merino MJ, Mussoll J, Palomera E, Papiol M, Pous E, Pubill M, Puig J, Puig-Domingo M (Project co-director), Sanahuja J, Serra P, Serra-Prat M (Project co-director), Serrano C, Vilardebò A, Villarroya I.

1096-6374/\$ – see front matter © 2011 Published by Elsevier Ltd.
doi:10.1016/j.ghir.2011.03.007

Ageing is characterized by a progressive decline in functional capacity, with a reduction in the ability to control basal homeostasis associated with an increased susceptibility to develop diseases and disabilities [3]. Among the elderly population, some individuals enjoy a considerable healthy condition which supports the idea of a genetic background for successful ageing. Human longevity can also be explained as the result of a complex interaction between genetic and environment although the contributive factor of each is difficult to quantify [4]. Moreover, long lived people have peculiar metabolic characteristics, such as lower body mass index, low fasting plasma glucose and plasma insulin, less insulin resistance as well as preserved pancreatic β -cell function [3,5]. An impaired somatotrophic axis activity has been related to a poor ageing condition and increased mortality [6,7]. Overall, population studies seem to indicate an association between high circulating levels of IGF-I and colorectal cancer, due to its positive action in the regulation of proliferative

pathways [8] and a U-shaped relationship between bioactive IGF-I and cardiovascular risk, by virtue of which very high or very low IGF-I levels are linked to an excess of mortality [6,9].

Genetic variations in genes belonging to the Insulin/IGF-I pathway and circulating levels of IGF-I themselves have been studied in relation to longevity, metabolic diseases, dementia and cancer. Different polymorphisms of the IGF-I gene, as well as some polymorphic variants of the IGF-I receptor gene, have been reported to influence somatotrophic axis activity and longevity [4,10]. In particular, the 192 bp polymorphism of the IGF-I gene has been linked to total IGF-I age-related decline [1] and different pathologic conditions as type 2 diabetes and higher risk of myocardial infarction [11]. This gene variant is located in the promoter region and consists of a cytosine-adenosine repeat 1 kb upstream from the transcription site of the IGF-I gene and seems to have functional implications.

Furthermore, loss of muscle mass and strength is well-known in association with ageing in a process called sarcopenia. There is a high variability between individuals in the development of sarcopenia vs a more robust healthy ageing, which suggests an interaction between previous lifestyle and genetic background. As IGF-I is a potent anabolic agent, which declines with advancing age, it is reasonable to expect that IGF-I may influence muscle mass and strength and that IGF-I polymorphisms may be related to differences in muscle function and metabolic phenotypes in ageing individuals. Different studies have found that variants of IGF-I pathway genes may influence the strength-training response [12]. However, the role of genetic variations in the IGF-I gene promoter on body composition and cardiometabolic risk is still a matter for research.

The purpose of the present study was to investigate the 192 bp polymorphism of IGF-I gene promoter and its relationship with different phenotype conditions which develop during ageing, such as metabolic syndrome and cardiovascular risk, mental and nutritional state decline, muscle strength variation and functional capacity scores in aged Spanish subjects.

2. Subjects and methods

2.1. Study population

All subjects of the present study were participating in the Mataró Ageing Study, a population-based cohort study designed to identify risk factors of frailty among older people who were selected from the inhabitants of Mataró and Argentona (Barcelona, Spain), and have been previously described elsewhere [13]. All non-institutionalized residents aged 70 years or older were eligible for the study. Exclusion criteria included severe physical or mental disability that did not permit visits to the study centre. Sample selection was done on a random basis from the municipal census. A total of 824 individuals of both sexes were invited to participate, this was first done by postal contact, followed by a telephone call from May 2002 to June 2003. Of those invited to participate, 176 (21.3%) were excluded because of non-fulfilment of selection criteria and 87 (10.6%) because of impossibility to contact after attempting three times by telephone. Of the remaining 561 individuals, 139 (24.8%) did not accept to participate, 62 (11%) accepted but did not come to the appointment-visit and 47 (8.4%) declined to participate for other social reasons. Finally, 313 cases participated in the study (inclusion rate of 55.8%). As more than 95% of people older than 65 living in Argentona and Cirera-Molins are visited in the facilities, individuals not participating in the study but initially contacted were reevaluated by examination of the clinical records of Consorci Sanitari del Maresme health care database and no differences were found in age and sex distribution compared to participants, as well as comorbidities including cardiovascular, rheumatologic, metabolic and mental disturbances, also including neoplastic diseases.

Biological samples for genetic studies were obtained in 292 individuals (144 men and 148 women). The Ethics Committee of the Consorci Sanitari del Maresme approved the study protocol and all participants signed an informed consent before entering.

2.2. Data collection

Questionnaires for the evaluation of mental, nutritional and functional condition, physical assessments and procedures were performed at two Primary Health Care Centres by a trained fieldwork team composed of 10 general practitioners.

The study protocol included in the first visit a review of the electronic medical history of the individual and/or a re-evaluation in case of no previous registration in the Consorci Sanitari del Maresme medical history database. Chronic and previous diseases, life style factors, education, a physical examination and a laboratory study for biochemical, hormonal and genetic determinations were recorded in the database. The physical examination included weight and height measures with subjects wearing light clothes; waist circumference was measured in standing position in a line between the last rib and the iliac crest. Blood pressure was measured twice with the subject being seated after 5 minutes rest, the mean of two readings was used in the analyses.

Muscle strength assessment was performed by measuring: 1) isometric leg extensor strength at 120° of both legs using a Hoggan MicroFET hand held dynamometer (in Newton units) as described by Hsieh and Philips [14] and 2) isometric hand grip strength with the adjustable hand held JAMAR dynamometer (in kg units) in the non-dominant hand, as described by Hamilton [15]. For each strength determination, three measurements were performed and the mean of these three measures was used in the analysis.

Functional capacity was assessed by calculation of Barthel score [16] and considered optimal when score = 100. All participants were also given the short version of the Mini Nutritional Assessment (MNA-SF) to assess nutritional risk [17]. This questionnaire classifies subjects in two categories; well nourished (if >10 points) or at risk of malnutrition (if ≤10 points). The Mini Mental State Examination (MMSE) was used to assess cognitive function and subjects with >24 points were considered not deteriorated [18]. We divided the level of cognitive deterioration according to MMSE in slight impairment (MMSE 21–24), moderate (MMSE 17–20) and severe (MMSE <17).

Blood samples for all measurements were obtained after a 12 hour fast through the night. Glucose and lipids were analysed by enzymatic techniques. Total IGF-I was measured by using a two-side immunoradiometric assay (Immunotech IGF-I kit, Immunotech-Beckman, Marseille, France; intra-assay variation coefficients (CV): <6.3%; interassay CV : 6.8%; sensitivity: 30 µg/l). IGF-BP-3 was measured by using an immunoradiometric chemiluminescent assay (Immulate 2000, Siemens Healthcare Diagnostics Inc, sensitivity 0.02 mg/l with an interassay imprecision <6%).

2.3. Metabolic syndrome (MS) definition

We used the Adult Treatment Panel III (ATP III) definition of MS [19]. Individuals were classified as having MS if the waist circumference was >102 cm in men or >88 cm in women plus two or more of the following: (i) arterial blood pressure >130/85 mmHg or antihypertensive treatment, (ii) triglycerides >150 mg/dl or hypertriglyceridemia treatment, (iii) high density lipoprotein (HDL) ≤40 mg/dl in men or ≤50 mg/dl in women, or (iv) fasting glucose ≥100 mg/dl or diabetes.

2.4. IGF-I polymorphisms

To determine the length of the polymorphic region cytosine-adenine repeat located 1 Kb upstream of the IGF-I gene promoter the

following strategy was used: different amplifications by PCR were made using a forward primer labeled with FAM (A1) and three reverse primers (A2, A3 and A4) located at different distances giving rise to fragments with different sizes that can be run together. The sequences of primers used were: A1.- 5'-ACCACTCTGGGAGAAGG-3', A2.- 5'-GCTAGCCAGCTGGTGT-3', A3.- 5'-CAGTCACCCAGTTGAGG-3' and A4.- 5'-GGCAAAGGCAAGTGTAC-3'.

A1 and A2 primers have been described previously [11]. The PCR reaction was carried out in a final volume of 25 µl containing 30 ng of genomic DNA obtained from peripheral blood leukocytes. For each reaction 2.5 µl of buffer X10 (# 11271318001, Roche), 200 µM of dNTPs, 0.25 µM each primer and 1 U of Taq polymerase (Roche) were used. Reaction conditions were: 35 cycles of 94 °C 30 s, 56 °C 30 s and 72 °C 30 s. The resulting products of the amplification were checked on 2% agarose gel. Fragments were analyzed in a sequencer (#3130 Avant, Applied Biosystems). The size of the products was determined in comparison with internal standard Genescan 500ROX (Applied Biosystems).

2.5. Data analysis

Categorical variables were expressed by percentages, and continuous data by mean ± standard deviation. To compare these percentages between two or three groups (homozygous vs heterozygous + non carriers of 192 bp allele or homozygous vs heterozygous vs non carriers of 192 bp allele), the Chi-square test was used.

To compare means of continuous variables between three groups, the ANOVA test was used for data with a normal distribution and the Kruskal–Wallis test for data without a normal distribution. When the comparison was between two groups, the *t*-student test was used for variables with a normal distribution, and *U* of Mann–Whitney test for data without normal distribution. Variables showing an association with a *p* value <0.20 in the univariate analysis were included in the model if they did not show multi-colineality with other variables included. Logistic/multiple regression was used as suitable to adjust by gender, age and BMI. Accepting an alpha risk of 0.05 and a beta risk of 0.10 in a one-sided test, and considering a 50% of homozygous in the IGF-I gene in general population as previously described [1] without metabolic syndrome (MS), 102 subjects per group was necessary to recognize a statistically significant difference greater than or equal to 20% in the prevalence of homozygous in the IGF-I gene in subjects with MS. Accepting that half of the study sample present a MS, a total of 204 subjects were needed.

3. Results

3.1. Distribution of IGF-I promoter gene polymorphisms in relation to gender, anthropometric parameters and IGF-I levels

Characteristics of the individuals participating in the study according to gender are described in Table 1. The 192 bp allele of the IGF-I gene promoter was distributed in the total population as: 41.9% homozygous, 44.3% heterozygous and 13.9% of non-carriers of this allele. Characteristics of individuals according to IGF-I polymorphism are described in Table 2. Fig. 1A shows the relationship between IGF-I levels and age and Fig. 1B to D the same relationship in the three IGF-I genotypes. Table 3 shows the association between IGF-I levels and gender and genotype.

3.2. 192 bp IGF-I promoter gene polymorphisms in relation to metabolic syndrome and cardiovascular morbidities

MS according to ATP-III criteria was found in 49.5% (41.4% in men and 57.6% in women). No differences in blood pressure, lipid profile and glycaemia were found when homozygous were compared to heterozygous or non-carriers of the 192 bp allele. When homozygous

Table 1

Characteristics of the individuals according to the gender.

	Men	Women	<i>p</i>
Age (years)	76.7 ± 5.4	77.3 ± 6.4	ns
BMI (kg/m ²)	27.2 ± 3.7	29.0 ± 4.3	<0.01
Systolic BP (mm Hg)	141.1 ± 18.8	145.0 ± 23.7	ns
Diastolic BP (mm Hg)	79.5 ± 13.1	81.7 ± 14.3	ns
Hypertension <i>n</i> (%)	75 (49.3)	87 (56.1)	ns
Total Cholesterol (mg/dl)	203.9 ± 37.2	217.1 ± 37.3	<0.01
Triglycerides (mg/dl)	129.0 ± 84.8	126.3 ± 64.3	ns
LDL (mg/dl)	126.5 ± 33.8	132.3 ± 33.6	ns
HDL (mg/dl)	50.9 ± 10.8	58.7 ± 13.2	<0.01
Fasting glucose (mg/dl)	108.7 ± 29.3	105.9 ± 25.8	ns
Diabetes <i>n</i> (%)	30 (19.7)	35 (22.6)	ns
Waist circumference (cm)	101.8 ± 11.4	101.5 ± 11.1	ns
Metabolic syndrome <i>n</i> (%)	84 (54.9)	98 (61.0)	ns
Coronary disease <i>n</i> (%)	27 (17.8)	15 (9.7)	ns
Stroke <i>n</i> (%)	17 (11.2)	21 (13.5)	ns

Values are mean ± standard deviation. BMI: body mass index, BP: blood pressure.

for 192 bp were compared to heterozygous and non-carriers, there were no differences in relation to waist circumference, blood pressure, lipid profile and glycaemia (Table 4). A trend towards a higher waist circumference was observed in heterozygous + non-carriers in comparison to homozygous (72.1 vs 62% respectively; *p* = 0.07 and after adjustment by gender, age and BMI, *p* = 0.18). MS was present in 41.9% of homozygous and 54.9% heterozygous + non-carriers, (*p* = 0.03; and after adjustment by gender, age and BMI, *p* = 0.04 and OR 1.70 (1.01–2.85)). No differences in IGF-I levels were observed between subjects in relation to MS presence (111 ± 37 µg/l in individuals with MS vs 106 ± 35 µg/l in individuals without MS, *p* = 0.217).

Regarding MS individual components according to gender, in men (*n* = 144) there were no differences in anthropometric variables, blood pressure, lipid profile and glycaemia. However, in women (*n* = 148), blood pressure was lower in homozygous individuals (*p* = 0.01, and after adjustment by age and BMI, *p* < 0.01 and OR 4.37 (1.64–11.62, homozygous vs heterozygous + non-carriers), there was a trend towards better HDL levels in homozygous individuals (*p* = 0.08, and after adjustment by age and IGF-I levels, *p* = 0.19) with no differences in anthropometric variables and glycaemia found.

21.2% of the individuals had diabetes (*n* = 65), 12.4% had vascular cerebral disease (*n* = 38%), 13.7% ischemic cardiopathy (*n* = 42) and 12.1% cancer (*n* = 37). The prevalence of vascular cerebral disease (12.4% in homozygous, 11.1% in heterozygous and 12.8% in non-carriers, *p* = 0.94), ischemic cardiopathy (13.2% in homozygous, 15.1% in heterozygous and 10.3% in non-carriers, *p* = 0.734) and cancer (10.7% in homozygous, 13.5% in heterozygous and 15.4% in non-carriers, *p* = 0.69) was similar among the three allelic groups. There was no association between the prevalence of diabetes and the genotype distribution (27.3% in homozygous, 15.1% in heterozygous and 23.1% in non-carriers, *p* = 0.06). There were no differences in the prevalence of myocardial infarction and cerebrovascular disease among diabetic subjects according to 192 bp allele of the IGF-I gene (*p* = 0.54 and *p* = 0.55, respectively). No association was found between IGF-I levels and diabetes prevalence (109 ± 37 µg/l in individuals with diabetes vs 108 ± 36 µg/l in

Table 2

Characteristics of the individuals according to IGF-I polymorphism.

	Homozygous	Heterozygous	Non-carriers	<i>p</i>
Gender (M/W): %	46.5/37.8	43.1/44.6	10.4/17.6	ns
Age (years): mean(SD)	76.5 ± 5.8	77.3 ± 5.8	76.5 ± 7.1	ns
Height (cm): mean(SD)	158.6 ± 9.5	157.8 ± 9.5	158.8 ± 8.4	ns
IGF-I (µg/l): mean(SD)	107 ± 36	109 ± 38	105 ± 31	ns
IGFBP-3 (mg/l): mean (SD)	2.5 ± 0.7	2.5 ± 0.6	2.6 ± 0.6	ns
IGF-I/IGFBP-3: mean (SD)	43.3 ± 14.3	43.9 ± 14.3	41.0 ± 9.0	ns

SD: standard deviation.

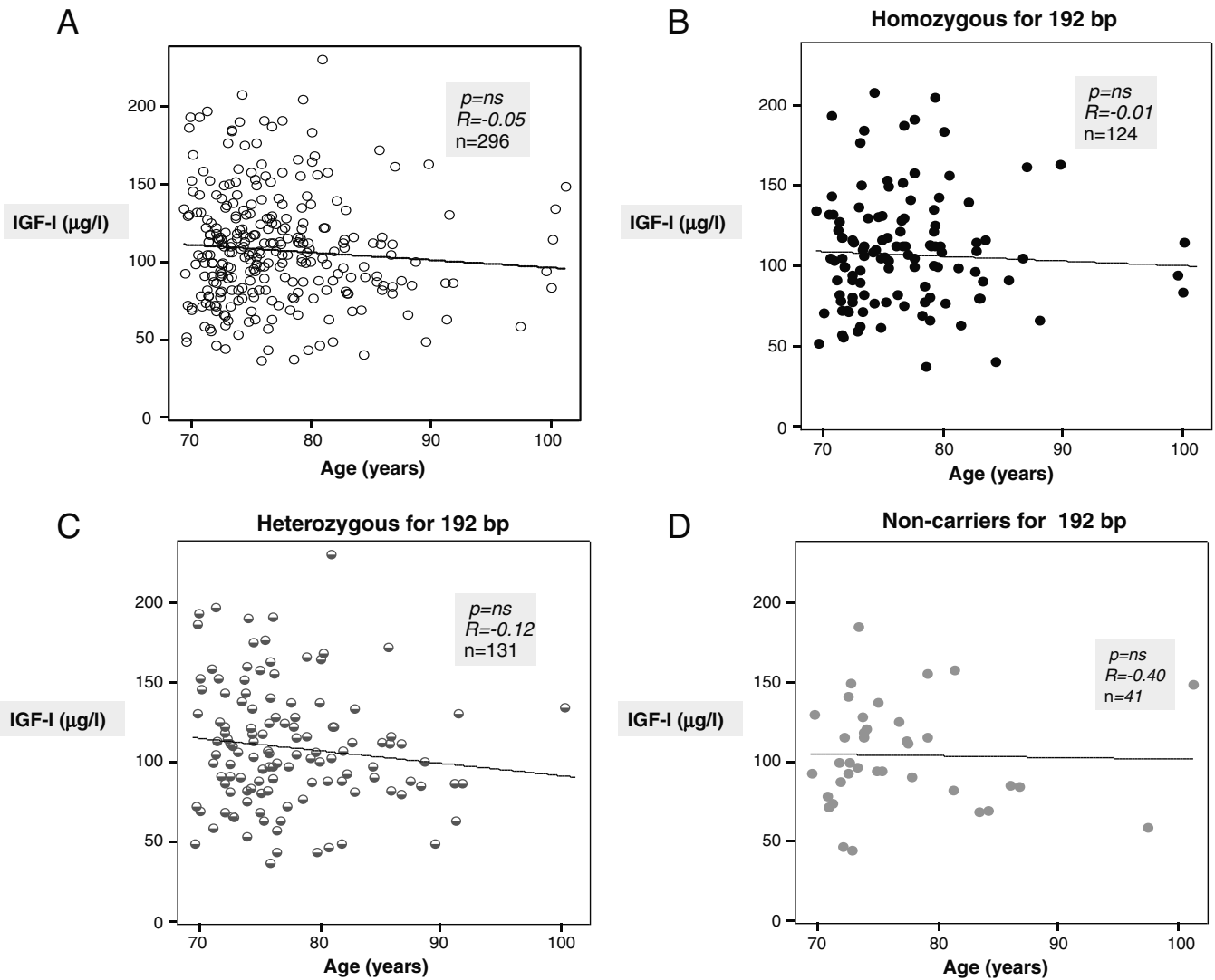


Fig. 1. Relationship between IGF-I levels (µg/l) and age (A) and in the three IGF-I haplotypes: homozygous (B), heterozygous (C) and non-carriers (D) for 192 bp.

individuals without diabetes, $p=0.84$), vascular cerebral disease ($106 \pm 38 \mu\text{g/l}$ in individuals with the event vs $108 \pm 36 \mu\text{g/l}$ in individuals without, $p=0.75$), ischemic cardiopathy ($103.2 \pm 31.1 \mu\text{g/l}$ in individuals with the event vs $109 \pm 37 \mu\text{g/l}$ in individuals without, $p=0.38$) and cancer ($105 \pm 29 \mu\text{g/l}$ in individuals with the event vs $108 \pm 37 \mu\text{g/l}$ in individuals without, $p=0.63$).

3.3. 192 bp IGF-I promoter gene polymorphisms in relation to mental, nutritional state and functional capacity

Mental state measured by MMSE was normal in 85.5% of homozygous, 80.3% of heterozygous and 79.4% of non-carriers

Table 3
IGF-I levels in relation to gender and genotype.

	Homozygous	Heterozygous	Non-carriers	Total	<i>p</i>
Men	$n=66$ 114 ± 38	$n=60$ 121 ± 40	$n=15$ 103 ± 35	$n=141$ 114 ± 39	$p=ns$
Women	$n=56$ 99 ± 35	$n=66$ 99 ± 33	$n=25$ 106 ± 29	$n=147$ 100 ± 32	$p=ns$
Total	$n=122$ 107 ± 36	$n=126$ 109 ± 38	$n=40$ 105 ± 31	$n=288$ 108 ± 36	$p=ns$
<i>p</i>	$p<0.01$	$p<0.01$	$p=ns$	$p<0.01$	

n: number of individuals; *p*: significant value IGF-I levels expressed in µg/l.

($n=261$, $p=0.01$, $p=0.44$ after adjustment for gender, age and BMI). No association was found between IGF-I levels and mental state ($p=0.25$).

Nutritional state by using MNA was satisfactory in 98.3% of homozygous, 96.6% of heterozygous and 88.2% of non-carriers ($n=265$, $p=0.03$, Fig. 2; after adjustment for gender, age and BMI, $p=0.03$ and OR 0.14 (0.02–0.85) for homozygous vs non-carriers). No association was found between IGF-I levels and nutritional state ($p=0.25$).

Barthel scale evaluated categorically was optimal in 63.6% of homozygous, 57.7% of heterozygous and 41% of non-carriers ($n=280$, $p=0.05$, Fig. 3; after adjustment for gender, age and BMI, $p<0.05$ and OR 2.25 (1.01–5.06) for homozygous vs non-carriers). There was a significant difference in IGF-I levels in relation to Barthel scale ($113 \pm 38 \mu\text{g/l}$ in individuals with optimal Barthel vs $102 \pm 34 \mu\text{g/l}$ in individuals with Barthel non optimal, $p=0.01$). After addition adjusting for IGF-I levels the association became almost significant ($p=0.08$, OR 1.40 (0.96–2.04)). When Barthel scale was evaluated as a continuous variable, differences between groups showed $p=0.08$ and after adjustment for gender, age, BMI and IGF-I levels, $p=0.04$.

When data were analyzed according to gender, MNA was better in homozygous men ($p<0.01$; Fig. 2) but no differences in MMSE and Barthel scales were observed. On the other hand, Barthel scale in

Table 4
Distribution of components of MS in homozygous compared to heterozygous + non-carriers.

	Homozygous		Heterozygous + non-carriers		p
	Normal (%)	Pathological (%)	Normal (%)	Pathological (%)	
Waist circumference	38.0	62.0	27.9	72.1	0.07
Triglycerides	79.8	20.2	72.5	27.5	ns
HDL	84.0	16.0	77.2	22.8	ns
Arterial hypertension	14.9	85.1	9.1	90.9	ns
Fasting glucose	47.9	52.1	50.3	58.4	ns
Metabolic syndrome	58.1	41.9	45.1	54.9	0.03

women was also better in homozygous individuals ($p = 0.05$, Fig. 3) with no differences in MMSE and MNA.

3.4. 192 bp IGF-I promoter gene polymorphisms and muscle strength

No differences were found in muscle strength in either men or women in relation to homozygosity, heterozygosity or non-carrier condition of the 192 bp allele of the IGF-I promoter gene (15.1 ± 8.1 kg, 14.7 ± 8.5 kg, 12.4 ± 6.7 kg, respectively; $p = 0.24$) neither when homozygosity vs heterozygosity + non-carriers was considered ($p = 0.21$). No differences were found by gender (men, $p = 0.30$; women, $p = 0.27$).

4. Discussion

Healthy ageing is driven by different environmental and genetic conditions that modulate the heterogeneity of this process among populations. The somatotrophic axis and its activity has claimed to be implicated both in healthy and non-healthy ageing, by virtue of which an improved or impaired IGF-I action may influence the development of diseases affecting longevity and survival with a U-shape effect [6,9]. In relation to this, circulating IGF-I levels in the upper normal range have been associated with a higher prevalence of prostate and colon cancer as well as increased muscle mass and muscle strength [20], while low levels are present in old and frail individuals with different degrees of disability [21] and premature mortality [7]. These findings have not been unanimously confirmed [22,23]. IGF-I levels can confidently reflect GH secretion in young well nourished subjects, while in old individuals IGF-I concentrations may be modulated by other non-GH factors, i.e. the nutritional state, obesity, sex steroid levels and insulin action. Moreover, some investigations have also demonstrated the existence of a genotype-specific pattern of age-related decrease in circulating IGF-I and IGFBP-3 linked particularly to homozygous carriers of the 192 bp allele of the IGF-I promoter gene. In subjects carrying this allele, a greater drop in IGF-I with age has been described in comparison with heterozygous and non-carriers [1].

This polymorphism is located 1 Kb upstream from the transcriptional area and contains specific regulatory elements that may modify IGF-I transcriptional activity, resulting in different IGF-I circulating levels [24–26]. In our study, we did not find a correlation with age in IGF-I levels according to 192 bp IGF-I allele homozygous condition as other authors. In the study by Rietveld and colleagues [1], individuals were younger than ours, with ages ranging from 60 to 75 years old, while in our cohort the age of subjects ranged from 70 to 85 years; therefore, it is feasible that in this later age range, no further decline of IGF-I would be expected, and as a consequence no relationship is found with a particular IGF-I genotype. On the other hand, not all the studies published so far have shown an association of 192 bp IGF-I gene polymorphism and IGF-I circulating levels, i.e. lower IGF-I levels in homozygous than heterozygous and non-carriers [27,28], as similar levels have also been reported [29]. The discrepancy of these observations might be due to chance, unknown confounders, variations in patterns of linkage disequilibrium between populations, different study designs and methods to measure IGF-I [30,31].

Also interesting is the fact that in the study by Rietveld, the higher height observed in homozygous individuals probably reflects a higher IGF-I lifespan exposure, a relationship we did not find in our cohort. This could be explained by the social background of our subjects, corresponding to immigrants from southern Spain who suffered from a limited food supply during their childhood in the 1950's due to the post-civil war Spanish situation. In fact, mean height in men was 164 cm and 153 cm for women, with no differences observed according to IGF-I genotype. In favour of this possibility is the fact that the mean post adolescent height in the Spanish population has increased about 10 cm from the 70's till now [32]. Furthermore, other studies have also shown the effect on secular trend of agrarian crises and World War II [33] reflecting the influence of genetic and environmental factors on growth and final height.

Also, and probably due to this age-related very low levels of IGF-I, we did not find any correlation of IGF-I circulating levels and metabolic syndrome condition in our cohort [34]. However, homozygous individuals showed a significantly overall healthier condition in

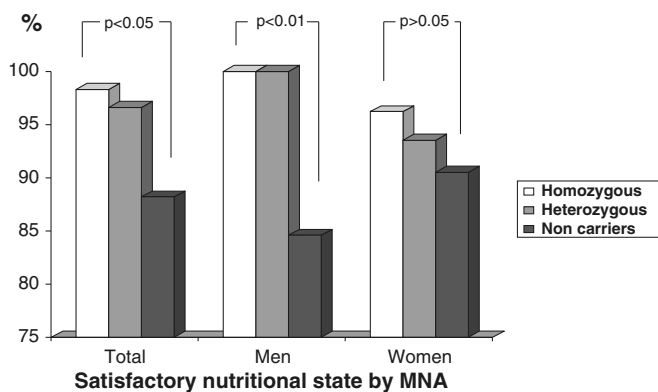


Fig. 2. Distribution of 192 bp IGF-I promoter gene polymorphisms among individuals in which MNA was satisfactory ($n = 255/265$; men = 128/130 and women = 127/135).

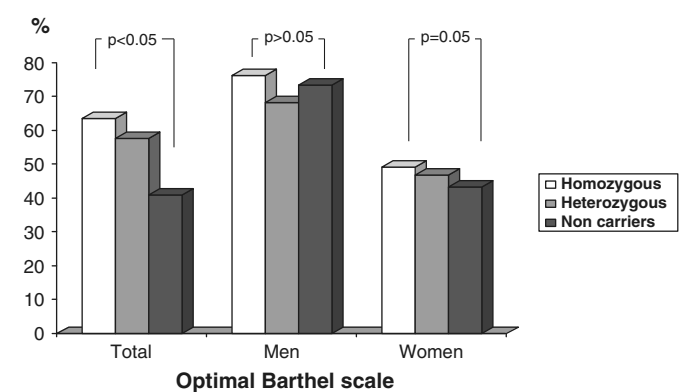


Fig. 3. Distribution of 192 bp IGF-I promoter gene polymorphisms among individuals in which Barthel was optimal ($n = 162/280$; men = 101/139 and women = 61/141).

comparison to non-homozygous, as they were less prone to have metabolic disturbances and in women hypertension was less frequent. Even if no differences were found according to the IGF-I genotype in relation to previous myocardial infarction and cerebrovascular disease, this may be due to a survival bias effect. Moreover individuals in our cohort with cardiovascular disease had the same circulating IGF-I levels, but IGFBP-3 and basal GH were lower in those with active coronary disease (data not shown). In contrast to our results, Vaessen et al. suggest that genetically determined exposure to relatively low levels of IGF-I are associated with increased risk of type 2 diabetes (T2D) and myocardial infarction [11]; in our study, no differences in T2D and cardiovascular diseases were seen, although our subjects showed certain metabolic protection when carrying the homozygous genotype. It could be that an insufficient follow-up or a lack of statistical power may also explain these dissimilarities in comparison with the results of the Rotterdam study. Although a substantial number of studies support the protective role of IGF-I in cardiometabolic diseases [35–37], contradictory results have been published in relation to the influence in IGF-I levels and metabolic vulnerability and body composition [23]; i.e., a recent study in early childhood found no differences in body mass index, total subcutaneous fat mass and waist–hip ratio and IGF-I genotypes [38]. Also, we found that homozygous women had lower blood pressure and a trend towards better HDL levels. Perticone et al. have also reported that IGF-I has a negative correlation with systolic blood pressure and a positive correlation with HDL [39]. We cannot explain these differences between genders, but a possible survival bias may have contributed to over-represent women with a better metabolic profile in our cohort.

Cognitive deterioration was less frequent in the homozygous subjects of our cohort with the nutritional status and functional capacity also being better in these subjects. Mental function has been shown to be affected by GH status; GH deficient subjects show impaired cognitive reactivity and GH treatment has been shown to exert cytoprotective actions [40,41], therefore a sustained lower IGF-I lifespan exposure may be associated to a less optimal mental condition during old age. It may be the case that even in our cohort with some potential non-favourable nutritional environment at younger ages, certain differential exposure to circulating IGF-I has happened and has been acting throughout, and this sustained different hormonal action has influenced the achievement of a better or worse nutritional and functional condition during ageing. As far as we know, this is the first study reporting a relationship between IGF-I polymorphisms and nutritional, cognitive and functional states. Therefore, if we assume that the genotype information is more relevant than a single measurement of IGF-I, and 192 bp homozygous is linked to a maintained decrease in IGF-I, it is tempting to speculate that this genetic trait may have differential protective influences for a healthier ageing condition.

Besides the metabolic, nutritional and mental function benefits associated with homozygous condition for the 192 bp allele of the IGF-I gene, no relationship was observed in our cohort with muscle strength, a recognized marker of frailty ageing. This concurs with the lack of relationship of IGF-I levels and muscle strength in our subject sample [12]. However, other studies have suggested a positive influence of IGF-I 192 bp polymorphism in muscle strength [20]. Our study in contrast to the one by Kostek, only evaluated basal muscle strength, while in the former, homozygous subjects performed better after muscle training, which was not done in our cohort. In this particular study, basal muscle volume and quality were not different by genotype.

Our study has several limitations. First, although the number of participating people is only about 300 from an initial sample of 824, which may jeopardize the randomness of sampling and extrapolation to general aged Catalan population, the comparability of recruited and non-recruited individuals permits the drawing of general conclusions from the final studied sample. In addition, the inclusion of a younger

sample of individuals would have overcome the problem of the overrepresentation of certain genotypes due to survival bias, and also, the current minority prevalence of non-carriers of 192 bp allele may have caused problems of statistical power in the sample. Additionally, the measurement of free IGF-I or IGF-I bioactivity [6,9] rather than total IGF-I would have helped to establish certain associations not found with the latter.

In conclusion, the homozygous condition for 192 bp allele of the IGF-I promoter gene may be a marker of a healthier aging in the Spanish population.

Declaration of interest

The authors have nothing to declare in relation to this article.

Funding

This work was supported by Fondo Investigaciones Sanitarias Grant 07/0601.

Acknowledgements

Special thanks to Nicole Van Beackel for reviewing the English version of the manuscript.

References

- [1] I. Rietveld, J.A. Janssen, A. Hofman, H.A. Pols, C.M. van Duijn, S.W. Lamberts, A polymorphism in the IGF-I gene influences the age-related decline in circulating total IGF-I levels, *Eur. J. Endocrinol.* 148 (2) (2003) 171–175.
- [2] R.D. Le, C. Bondy, S. Yakar, J.L. Liu, A. Butler, The somatomedin hypothesis: 2001, *Endocr. Rev.* 22 (1) (2001) 53–74.
- [3] M. Barbieri, A. Gambardella, G. Paolisso, M. Varricchio, Metabolic aspects of the extreme longevity, *Exp. Gerontol.* 43 (2) (2008) 74–78.
- [4] D. Albani, S. Batelli, L. Polito, A polymorphic variant of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor correlates with male longevity in the Italian population: a genetic study and evaluation of circulating IGF-1 from the “Treviso Longeva (TRELONG)” study, *BMC Geriatr.* 9 (2009) 19.
- [5] M. Bonafe, F. Olivieri, Genetic polymorphism in long-lived people: cues for the presence of an insulin/IGF-pathway-dependent network affecting human longevity, *Mol. Cell. Endocrinol.* 299 (1) (2009) 118–123.
- [6] M.P. Brughts, A.W. van den Beld, L.J. Hofland, et al., Low circulating insulin-like growth factor I bioactivity in elderly men is associated with increased mortality, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (7) (2008) 2515–2522.
- [7] A.R. Cappola, Q.L. Xue, L. Ferrucci, J.M. Guralnik, S. Volpato, L.P. Fried, Insulin-like growth factor I and interleukin-6 contribute synergistically to disability and mortality in older women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (5) (2003) 2019–2025.
- [8] M. Zecevic, C.I. Amos, X. Gu, et al., IGF1 gene polymorphism and risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (2) (2006) 139–143.
- [9] M.P. Brughts, C.M. van Duijn, L.J. Hofland, J.C. Witteman, S.W. Lamberts, J.A. Janssen, IGF-1 bioactivity in an elderly population: relation to insulin sensitivity, insulin levels, and the metabolic syndrome, *Diabetes* 59 (2) (2010) 505–508.
- [10] M. Bonafe, M. Barbieri, F. Marchegiani, et al., Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (7) (2003) 3299–3304.
- [11] N. Vaessen, P. Heutink, J.A. Janssen, et al., A polymorphism in the gene for IGF-I: functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction, *Diabetes* 50 (3) (2001) 637–642.
- [12] B.D. Hand, M.C. Kostek, R.E. Ferrell, et al., Influence of promoter region variants of insulin-like growth factor pathway genes on the strength-training response of muscle phenotypes in older adults, *J. Appl. Physiol.* 103 (5) (2007) 1678–1687.
- [13] M. Puig-Domingo, M. Serra-Prat, M.J. Merino, M. Pubill, E. Burdoy, M. Papiol, Muscle strength in the Mataro aging study participants and its relationship to successful aging, *Ageing Clin. Exp. Res.* 20 (5) (2008) 439–446.
- [14] C.Y. Hsieh, R.B. Phillips, Reliability of manual muscle testing with a computerized dynamometer, *J. Manipulative Physiol. Ther.* 13 (2) (1990) 72–82.
- [15] A. Hamilton, R. Balnave, R. Adams, Grip strength testing reliability, *J. Hand Ther.* 7 (3) (1994) 163–170.
- [16] F.I. Mahoney, D.W. Barthel, Functional evaluation: The Barthel index, *Md State Med. J.* 14 (1965) 61–65.
- [17] L.Z. Rubenstein, J.O. Harker, A. Salva, Y. Guigoz, B. Vellas, Screening for undernutrition in geriatric practice: developing the short-form mini-nutritional assessment (MNA-SF), *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.* 56 (6) (2001) M366–M372.
- [18] M.F. Folstein, S.E. Folstein, P.R. McHugh, Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician, *J. Psychiatr. Res.* 12 (3) (1975) 189–198.

- [19] Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III), *JAMA* 285 (19) (2001) 2486–2497.
- [20] M.C. Kostek, M.J. Delmonico, J.B. Reichel, et al., Muscle strength response to strength training is influenced by insulin-like growth factor 1 genotype in older adults, *J. Appl. Physiol.* 98 (6) (2005) 2147–2154.
- [21] A.R. Cappola, K. Bandeen-Roche, G.S. Wand, S. Volpato, L.P. Fried, Association of IGF-I levels with muscle strength and mobility in older women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (9) (2001) 4139–4146.
- [22] J.A. Janssen, R.P. Stolk, H.A. Pols, D.E. Grobbee, S.W. Lamberts, Serum free and total insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 Levels in healthy elderly individuals. Relation to self-reported quality of health and disability, *Gerontology* 44 (5) (1998) 277–280.
- [23] D.P. Kiel, J. Puhl, C.J. Rosen, K. Berg, J.B. Murphy, D.B. MacLean, Lack of an association between insulin-like growth factor-I and body composition, muscle strength, physical performance or self-reported mobility among older persons with functional limitations, *J. Am. Geriatr. Soc.* 46 (7) (1998) 822–828.
- [24] T.L. McCarthy, C. Ji, H. Shu, et al., 17beta-estradiol potently suppresses cAMP-induced insulin-like growth factor-I gene activation in primary rat osteoblast cultures, *J. Biol. Chem.* 272 (29) (1997) 18132–18139.
- [25] L.H. Naylor, E.M. Clark, d(TG)n.d(CA)n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription, *Nucleic Acids Res.* 18 (6) (1990) 1595–1601.
- [26] C.A. West, T.R. Arnett, S.M. Farrow, Expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA variants in rat bone, *Bone* 19 (1) (1996) 41–46.
- [27] T.M. Frayling, A.T. Hattersley, A. McCarthy, et al., A putative functional polymorphism in the IGF-I gene: association studies with type 2 diabetes, adult height, glucose tolerance, and fetal growth in U.K. populations, *Diabetes* 51 (7) (2002) 2313–2316.
- [28] C.J. Rosen, E.S. Kurland, D. Vereault, et al., Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: implications for genetic studies of bone mineral density, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (7) (1998) 2286–2290.
- [29] N.E. Allen, G.K. Davey, T.J. Key, S. Zhang, S.A. Narod, Serum insulin-like growth factor I (IGF-I) concentration in men is not associated with the cytosine-adenosine repeat polymorphism of the IGF-I gene, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11 (3) (2002) 319–320.
- [30] O. Fletcher, L. Gibson, N. Johnson, et al., Polymorphisms and circulating levels in the insulin-like growth factor system and risk of breast cancer: a systematic review, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (1) (2005) 2–19.
- [31] P. Hovind, S. Lamberts, W. Hop, et al., An IGF-I gene polymorphism modifies the risk of developing persistent microalbuminuria in type 1 diabetes, *Eur. J. Endocrinol.* 156 (1) (2007) 83–90.
- [32] A. Carrascosa, L. Audi, J. Bosch-Castane, et al., Influence of the age at the start of pubertal growth on adult height, *Med. Clin. (Barc)* 130 (17) (2008) 645–649.
- [33] J.C. van Wieringen, M.J. Roede, J.M. Wit, Growth diagrams for patient care, *Tijdschr Kindergeneeskd* 53 (4) (1985) 147–152.
- [34] M. Serra-Prat, S.R. Alfaro, E. Palomera, et al., Relationship between ghrelin and the metabolic syndrome in the elderly: a longitudinal population-based study, *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 70 (2) (2009) 227–232.
- [35] A. Juul, T. Scheike, M. Davidsen, J. Gyllenberg, T. Jorgensen, Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study, *Circulation* 106 (8) (2002) 939–944.
- [36] G.A. Laughlin, E. Barrett-Connor, M.H. Criqui, D. Kritiz-Silverstein, The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (1) (2004) 114–120.
- [37] A.E. Schutte, H.W. Huisman, J.M. van Rooyen, et al., A significant decline in IGF-I may predispose young Africans to subsequent cardiometabolic vulnerability, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (5) (2010) 2503–2507.
- [38] J.A. Maas, D.O. Mook-Kanamori, L. Ay, et al., Insulin VNTR and IGF-1 promoter region polymorphisms are not associated with body composition in early childhood: the generation R study, *Horm. Res. Paediatr.* 73 (2) (2010) 120–127.
- [39] F. Perticone, A. Sciacqua, M. Perticone, et al., Low-plasma insulin-like growth factor-I levels are associated with impaired endothelium-dependent vasodilatation in a cohort of untreated, hypertensive Caucasian subjects, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (7) (2008) 2806–2810.
- [40] A. Aleman, I. Torres-Aleman, Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan, *Prog. Neurobiol.* 89 (3) (2009) 256–265.
- [41] E.H. Quik, E.B. Conemans, G.D. Valk, J.L. Kenemans, H.P. Koppeschaar, P.S. Dam, Cognitive performance in older males is associated with growth hormone secretion, *Neurobiol. Aging* (2010).

ORIGINAL 3:

Mora M, Adam V, Palomera E, Blesa S, Díaz G, Buquet X, Serra-Prat M, Martín-Escudero JC, Palanca A, Chaves JF, Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group.

Ghrelin gene variants influence on metabolic syndrome components in aged Spanish population.

En revisión mayor por Plos One.

Ghrelin gene variants influence on metabolic syndrome components in aged Spanish population

M Mora¹, V. Adam², E Palomera³, S Blesa², G Díaz^{1,5}, X Buquet⁴, M Serra-Prat³, JC Martín-Escudero⁶, A Palanca⁷, JF Chaves^{2,8} and M Puig-Domingo⁷ and The Mataró Aging Study Group.

Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona, Spain¹. Genotyping and Genetic Diagnosis Unit, Research Foundation, Hospital Clinic of Valencia INCLIVA, Valencia, Spain². Research Unit and *Ciberhep*³ and Biochemistry Service⁴, Hospital of Mataró, Mataró, Spain. Hospital Clínico of Valladolid⁵, Valladolid, Spain. Internal Medicine Department⁶, Hospital Río Hortega, University of Valladolid, Valladolid, Spain. Department of Endocrinology and Nutrition⁷, CIBERER, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. CIBER Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Spain⁸.

Corresponding author: Manel Puig-Domingo, Germans Trias Research Institute and Hospital, Campus de Can Ruti, carretera de Canyet s/n, Badalona 08916, Spain; email: mpuigd@gmail.com, mpuigd@igtp.cat.

The Mataró Aging Study Group: Ayllón J, Buquet X, Bosch A, Burdoy E, Cadenas I, Dordas J, Espinosa C, Falcón I, Gordillo M, Merino MJ, Mussoll J, Palomera E, Papiol M, Pous E, Pubill M, Puig J, Puig-Domingo M (Project co-director), Sanahuja J, Serra P, Serra-Prat M (Project co-director), Serrano C, Vilardebò A, Villarroya I.

Short title: Ghrelin gene polymorphisms and metabolic syndrome

Conflict of interest: The authors have nothing to declare in relation to this article.

33 Abstract

34 **Background:** The role of genetic variations within the ghrelin gene on cardiometabolic
35 profile and nutritional status is still not clear in humans, particularly in elderly people.

36 **Objectives:** We investigated six SNPs of the ghrelin gene and their relationship with
37 metabolic syndrome (MS) components.

38 **Subjects and methods:** 824 subjects (413 men /411 women, age 77.31±5.04)
39 participating in the Mataró aging study (n=310) and the Hortega study (n=514) were
40 analyzed. Anthropometric variables, ghrelin, lipids, glucose and blood pressure levels
41 were measured, and distribution of SNPs -994CT (rs26312), -604GA (rs27647), -
42 501AC (rs26802), R51Q (rs34911341), M72L (rs696217) and L90G (rs4684677) of the
43 ghrelin gene evaluated. Genotypes were determined by multiplex PCR and SNaPshot
44 minisequencing. MS (IDF criteria) was found in 54.9%.

45 **Results:** No association between any of the SNPs and levels of total fasting circulating
46 ghrelin levels was found. C/A-A/A genotype of M72L was associated with increased
47 risk of central obesity according to IDF criteria, while G/A-G/G genotypes of -604GA
48 with reduced risk. A/A genotype of -501AC polymorphism was associated to decreased
49 BMI. In relation to lipid profile, the same genotypes of -604GA were associated with
50 reduced total cholesterol and LDL-cholesterol and -501AC with reduced triglycerides.
51 There were no associations with systolic or diastolic blood pressure levels or with
52 hypertension, glucose levels or diabetes and ghrelin polymorphisms. However, G/G
53 genotype of -604GA was associated with glucose >100 mg/dL. Haplotype analysis
54 showed that only one haplotype is associated with increased risk of waist circumference
55 and central obesity. The analysis of subjects by gender showed an important and
56 different association of these polymorphisms regarding MS parameters.

57 **Conclusion:** Ghrelin gene variants -604GA, -501AC and M72L are associated with
58 certain components of MS, in particular to BMI and lipid profile in elderly Spanish
59 subjects.

60

61

62 **Keywords:** Ghrelin polymorphisms, metabolic syndrome, obesity.

63

64

65 **Introduction**

66 Ghrelin is an hormone secreted especially in the stomach with an orexigenic effect,
67 stimulating appetite and food intake and playing an important role in regulating the
68 body energy homeostasis [1,2]. It has been suggested that age-related decline in
69 circulating ghrelin concentrations is one of the potential mechanisms involved in
70 reducing appetite in the elderly [3,4]. However, this decrease in fasting ghrelin
71 concentration in people over 70 years is quite modest and its physiological relevance
72 remains unclear [5]. An active participation of ghrelin in the regulation of energy
73 homeostasis probably persists until advanced age, as different studies have shown
74 greater ghrelin circulating concentrations as a potential compensatory mechanism in
75 malnourished aged subjects in comparison to well-nourished individuals [6,7]. Ghrelin
76 also appears to have vascular protective actions, and thus, its role in the development of
77 different cardiometabolic disturbances has been proposed.

78 The role of ghrelin in the MS risk is controversial, especially when we take into account
79 the different two major isoforms of ghrelin (desacyl and acylated ghrelin) [8].
80 Circulating ghrelin has been associated to the metabolism of glucose and lipids,
81 considering that both forms seem to have opposite effects. Acyl-ghrelin reduces the
82 release of insulin depending on glucose, decreases the sensibility to insulin and
83 promotes hyperglycemia while desacyl-ghrelin increases the sensibility to insulin and
84 maintains euglycemia, suggesting the opposite effect of the two isoforms of ghrelin in
85 the hepatic metabolism of glucose [9]. Moreover, ghrelin has a lipogenic effect,
86 inhibiting the synthesis of fatty acids [9] . In relation to MS, OPERA study has shown a
87 negative correlation between levels of total ghrelin and the number of components of
88 MS and MS per se: levels of ghrelin decrease when the number of components of MS
89 increases [10]. Previous data of the Mataró Aging Study have also shown this
90 association [11]. Recent reports have found that, as the number of components of the
91 metabolic syndrome increase, a progressive reduction in circulating desacyl ghrelin is
92 observed, while conversely, acylated ghrelin levels are increased [12] or unchanged
93 [13-14] in parallel with the presence of components of MS. However, it is not clear if
94 this association is causative or not. Moreover, the role of ghrelin in the development of
95 MS in aging individuals is still not well known.

96 The ghrelin polymorphisms most studied to date are located in the promoter and in the
97 coding regions of the gene and some of them have implications for gene activity [15].
98 The best known SNPS are Arg51Gln, located in the area that regulates the generation of
99 the active mature hormone, and Leu72Met and Gln90Leu, located elsewhere in the gene
100 [16]. Leu72Met (C247A) is in the gene region located between the coding regions of
101 obestatin and mature ghrelin. The functional consequences of this variation are
102 unknown, because even if the sequence of the mature ghrelin does not change, changes
103 in mRNA stability or changes in the processing of the protein could alter the secretion
104 of ghrelin and / or its activity [17]. The SNP for Gln90Leu (A265T) causes a change in
105 an amino acid peptide obestatin and the possible consequences of this change are
106 unknown [18]. The association of ghrelin polymorphisms with MS has been previously
107 studied with no coincident results: some show no association with metabolic alterations
108 [19] while others have found a relation [16,20,21]. For example, M72L has been
109 associated to MS, high-density lipoprotein, high triglyceride levels and high fasting
110 glucose [16,21]. Individuals carrying the 51Gln allele have a lower prevalence of MS in
111 comparison to non-carriers [16]. The purpose of our study was to describe the
112 distribution of -994CT (rs26312), -604GA (rs27647), -501AC (rs26802), R51Q
113 (rs34911341), M72L (rs696217) and L90G (rs4684677) ghrelin gene polymorphisms
114 and their relationship with MS in an elderly Spanish population.

115

116

117 **Subjects and methods**

118

119 **Study population**

120

121 All subjects of the present study were participants of the Mataró Aging Study (n=310)
122 and Hortega Study in Valladolid (n=514), two Spanish population-based cohort studies
123 designed to identify cardiovascular risk factors for frailty and successful aging condition
124 among old people. Table 1 shows the characteristics of both cohorts.

125

126 In the Mataró Aging Study, the participants were selected from the inhabitants of
127 Mataró and Argentona (Barcelona, Spain) and have been previously described
128 elsewhere [22]. All non-institutionalized residents aged 70 years or older were eligible

129 for the study. Exclusion criteria included severe physical or mental disability that did
130 not allow visiting the study center and individuals with previous gastric surgery. Sample
131 selection was done on a random basis from the municipal census. A total of 824
132 individuals of both sexes were invited to participate, this was first done by postal
133 contact, followed by a telephone call from May 2002 to June 2003. Of those invited to
134 participate, 176 (21.3%) were excluded because of non-fulfillment of selection criteria
135 and 87 (10.6 %) because of the impossibility of contacting them after three attempts by
136 telephone. Of the remaining 561 individuals, 139 (24.8%) did not accept to participate,
137 62 (11%) accepted but did not come to the appointment-visit and 47 (8.4%) declined to
138 participate for other non-medical reasons. Finally, 310 cases participated in the study.
139 As more than 90% of the population over 70 in this geographical area of the Maresme
140 in Barcelona are followed at the Primary Health Care Centers of the Maresme Health
141 Consortium, comparisons between individuals initially contacted but not participating in
142 the study and participants performed by using the electronic clinical records database
143 did not show differences in age and sex distribution, or in comorbidities (including
144 cardiovascular, rheumatologic, metabolic and mental disturbances and neoplastic
145 diseases).

146
147 Biological samples for genetic studies were obtained from 292 individuals (144 men
148 and 148 women). The Ethics Committee of the Maresme Health Consortium approved
149 the study protocol and all subjects signed an informed consent before entering.

150
151 The Hortega Study is a two-stage population-based survey carried out from 1997 to
152 2003 in adults 14-84 years old from Valladolid (Spain) [23]. The selection of
153 individuals was conducted based on a listing from different local registers, including the
154 universal health care system, which provides a more extensive representation of
155 individuals living in the area than the official census of inhabitants. In the first stage, the
156 20% of the 214,445 individuals included in the registers was randomly selected and
157 invited by telephone and mail to participate in the study. The response rate was 50%.
158 An independent study was performed to compare participants who did and did not
159 respond, without significant differences in socioeconomic and cardiovascular risk
160 factors. Among the individuals who responded, ~250 individuals were randomly
161 selected from 6 sex-specific age strata to undergo interview and clinical examination
162 and to provide biological samples. If the contact could not be established, or the

163 individual refused to participate in the study, the investigator had the possibility of
164 recruiting another individual from the same strata using a reserve list. Individuals were
165 excluded from this survey for the presence of serious concomitant diseases or disorders
166 that could influence the collection of reliable information, or any mental or social
167 condition that could complicate or prevent participation of the individual in the study.
168 After signing an informed consent form, plasma samples were drawn and stored for
169 metals determination, resulting in 1,502 participants available for the present study.
170 From them, 514 participants were 70 years old or over and included in the present
171 study. The research protocol was approved by the local Ethics Committee of the
172 Hospital Río Hortega.

173

174

175 **Data collection**

176

177 Questionnaires for geriatric evaluation and physical assessment were performed by
178 trained teams in Mataró and Valladolid with a low inter-team variability regarding all
179 the procedures related to the study. The study protocol included a revision of the
180 electronic medical history of the individual as well as a global geriatric evaluation when
181 individuals entered the study. Chronic and previous diseases, life style factors,
182 education, a physical examination and a laboratory study for biochemical, hormonal and
183 genetic determinations were recorded in a specific database designed for the study. The
184 physical examination included measurement of weight (in kg) and height (in cm); waist
185 circumference was measured in standing position in a line between the last rib and the
186 iliac crest. Body mass index (BMI) was calculated as weight divided by height (meters)
187 squared. Blood pressure was measured twice with the subject seated after 5 minutes
188 rest, the mean of two reading was used in the analyses. These data have been previously
189 described elsewhere [24].

190

191

192 **Hormonal measurements**

193

194 Blood samples for all measurements were obtained after a 12-hour fast through the
195 night. Glucose and lipids were analyzed by enzymatic techniques. Total plasma ghrelin

196 concentrations were measured with a human radioimmunoassay (RIA) kit (Linco
197 Research Inc, St Charles, MO). The detection limit was 93 pg/mL with intra- and inter-
198 assay variation coefficients of 11.1% and 14.7%, respectively. These data have been
199 previously described elsewhere [24].

200

201 **Metabolic syndrome (MS) definition**

202

203 We used the International Diabetes Federation (IDF) definition of MS [25]. Individuals
204 were classified as having MS if the waist circumference was > 94 cm in men or > 80 cm
205 in women plus two or more of the following: (i) arterial blood pressure > 130/85 mmHg
206 or antihypertensive treatment, (ii) triglycerides > 150 mg/dL or use treatment, (iii) high
207 density lipoprotein (HDL) \leq 40 mg/dL in men or \leq 50 mg/dL in women, or (iv) fasting
208 glucose \geq 100 mg/dL or previous diabetes diagnosis. Additionally, for data analysis in
209 relation to ghrelin polymorphisms, waist circumference was also used as a continuous
210 variable.

211

212

213 **Ghrelin gene polymorphisms**

214

215 Six single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the ghrelin gene (*GHRL*) were
216 investigated in this cohort: -994CT (rs26312), -604GA (rs27647), -501AC (rs26802),
217 R51Q (rs34911341), M72L (rs696217) and L90G (rs4684677). DNA was isolated from
218 peripheral blood cells using the Chemagic System (Chemagen; Baesweiler, Germany).
219 Polymerase chain reaction (PCR) amplicons were designed by Primer3 program [26], to
220 amplify the regions of interest of promoter, exon 1, exon 3 and exon 4 of *GHRL*. The
221 size of PCR products was analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels. Products
222 were treated with Exonuclease I (Amersham Biosciences) and shrimp alkaline
223 phosphatase (Amersham Biosciences) to remove excess primers and deoxynucleotide
224 triphosphates. For the examination of the six SNPs, extension SNaPshot primers
225 specific to the polymorphic sites were used for the SNaPshot minisequencing reaction
226 using the ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems). The resulting
227 products were purified by using one unit of Calf Intestine Phosphatase (New England
228 Biolabs, Ipswich, MA). Snapshot products were resuspended in 4.5 μ L Hi-Di™

229 Formamide (Applied Biosystems) and 0.5 μ L GeneScan Size Standard. They were then
230 electrophoretically analyzed using a DNA Analyzer 3730 (Applied Biosystems). The
231 results of genotyping were analyzed and evaluated by GeneMapper software v. 3.7
232 (Applied Biosystems). All polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. These
233 data have been previously described elsewhere [24].

234

235 **Data analysis**

236

237 Categorical variables were expressed by percentage and continuous data by mean
238 (standard deviation). Allele and genotype frequencies and Hardy–Weinberg equilibrium
239 for every SNP were calculated by chi-square test with one degree of freedom. SNPs
240 associations with MS components were analyzed by ANOVA test for data with a
241 normal distribution and the Kruskal-Wallis test for data without a normal distribution.
242 Analysis of association with a response variable was based on linear or logistic
243 regression depending on quantitative or categorical variables. The analyses were
244 performed as crude and then adjusted for age, gender and BMI. We started with a co-
245 dominant model of inheritance in the association studies and if the mean of two
246 genotypes (one homozygous and heterozygous) were similar, we used dominant or
247 recessive models. The model with lower AIC (Akaike information) was used for every
248 SNP. Haplotypes were estimated by the Expectation Maximization Algorithm, and
249 haplotype association with different components of MS were calculated by logistic
250 regression models and adjusted for age, gender and BMI as covariates. All analyses
251 were performed using SPSS package and SNP Stats software [27]. We considered
252 results to be statistically significant when association showed a P value <0.05 . Odds
253 ratio was used to evaluate the association of the different pathological conditions
254 considered with each SNP or haplotype. These data have been previously related [24].

255

256

257 **Results**

258

259 **Distribution of ghrelin gene polymorphisms in relation to**
260 **gender and correlation with ghrelin levels**

261

262 Eight hundred and twenty-four individuals were included in the present study (413
263 men/411 women; 50.1% vs 49.9%, respectively); their anthropometric characteristics
264 are described in Table 1. In relation to components of MS according to IDF criteria,
265 84.1% of individuals had high waist perimeter (central obesity), 45.2% had triglyceride
266 levels higher than 150 mg/dl, 39.0% had low HDL levels, 72.7% had hypertension and
267 13.9% were diabetic; as a consequence, 74.1% had MS.

268 The prevalence of the different genotypes (-994CT, -604GA, -501AC, R51Q, M72L
269 and L90G) is shown in S1.A table. No differences were observed between genders in
270 the distribution of polymorphisms. Linkage disequilibrium of the polymorphisms are
271 shown in S1.B table.

272

273

274 **Ghrelin gene polymorphisms, ghrelin levels and components**
275 **of metabolic syndrome**

276

277 No associations were found between the six SNPs and the levels of total fasting
278 circulating Ghrelin levels in the subgroup of individuals in which this was evaluated
279 (Mataró cohort).

280

281 According to IDF criteria, M72L and -604GA polymorphisms were associated with
282 central obesity (COB); these associations remained statistically significant after BMI,
283 age and gender adjustment (Table 2). Haplotype analysis showed a significant
284 association of haplotype 4 with increased waist perimeter and central obesity risk,
285 which also remained significant after BMI, age and sex adjustments (Table 3) and
286 including the two alleles associated with increased risk for COB found in.

287

288 Polymorphism -501AC was associated with BMI ($p=0.031$), the A/A genotype was
289 associated with lower BMI, showing a trend to significance after adjusting for age and
290 gender ($p=0.076$; see Table 2). No associations were found for any of the SNPs studied

291 with obesity. However, when being overweight together with obesity were considered
292 as a single categorical variable (BMI ≥ 25 Kg/m²), R51Q G/G was significantly
293 associated with being overweight in comparison to A/G (OR 4.35 (0.90-20); p=0.041
294 after adjusting for age and gender). There were no significant associations of ghrelin
295 haplotypes with BMI or obesity, although haplotype 4 showed a trend for increased
296 obesity risk after adjustment for age and sex (Table 3).

297

298 There were no associations of ghrelin polymorphisms with systolic or diastolic blood
299 pressure levels, hypertension, glucose levels or hyperglycaemia, according to IDF
300 criteria, and no association with diabetes.

301

302 In relation to lipid profile; -604GA polymorphism was associated with total cholesterol
303 and LDL-cholesterol and -501AC was linked to LDL-cholesterol and triglycerides, but
304 no association was found with HDL-cholesterol (table 4). For -604GA polymorphism,
305 the A/A genotype showed lower total and LDL-cholesterol but statistical significance
306 was lost after adjustment. According to IDF criteria for MS, as expected, an association
307 was found between triglycerides and -501AC polymorphism: 63.4% carriers A/C+C/C
308 vs 36.6% A/A had pathological levels of triglycerides (OR A/A+C/C vs A/A 1.33 (1.10-
309 1.77); p=0.041 and 1.35 (1.00-1.82) p=0.048, after adjusting for age and gender). No
310 association was found with HDL cholesterol. Haplotype analysis showed that minority
311 haplotypes were associated with variations in triglycerides but not with a risk of having
312 high levels, according to IDF criteria.

313

314 No association was found between MS according to IDF criteria and ghrelin
315 polymorphisms. However, carriers of the A/A genotype in -501AC polymorphism
316 presented a lower number of MS components in comparison to A/C+C/C: 2.43 (0.07) vs
317 2.63 (0.06), difference in mean 0.19 (0.02-0.37), p=0.031, after adjusting for age and
318 gender, p=0.062.

319

320 **Analysis by gender**

321

322 In men, the R51Q polymorphism was associated with waist circumference. A/G
323 genotype was associated with higher waist circumference (A/G: 108 (2.68) cm vs G/G

324 100.63 (0.48) cm, difference in mean (CI: 95%), adjusted for age and BMI 5.57 (0.18-
325 10.96) cm, p=0.043) (table 5). The -604GA and M72L polymorphisms were associated
326 with central obesity by IDF criteria. Carriers of the A/A genotype in -604GA presented
327 a higher risk of COB (OR: 2.27 (1.11-4.54); p=0.020 after adjusting for age and BMI)
328 and carriers of the A/C genotype in M72L presented a higher risk of COB (OR: 3.03
329 (1.10-8.40); p=0.023 after adjusting for age and BMI) (table 5). No association was
330 found with lipid profile, glucose levels, diabetes or hypertension. Also -604GA and
331 M72L polymorphisms were associated with metabolic syndrome according to IDF
332 criteria. Carriers of A/A genotype in -604GA presented higher risk of MS (OR: 2.32
333 (1.021-5.26); p=0.038 after adjusting for age and BMI) and carriers of A/C genotype in
334 M72L presented higher risk of MS (OR: 5.27 (1.54-18.03); p=0.004 after adjusting for
335 age and BMI).

336

337 In women, the -501AC polymorphism was associated with being overweight, this being
338 more prevalent in C/C carriers compared to A/A-A/C (OR: 2.31 (1.14-4.65), p=0.015),
339 after adjusting for age OR: 2.28 (1.13-4.62), p=0.017). The L90G and -501AC
340 polymorphisms were associated with waist circumference (table 6). The A/A genotype
341 in L90G was associated with higher waist circumference (A/A: 96.08 (0.63) cm vs A/T
342 90.93 (2.86) cm; difference in mean adjusted for age and BMI: 4.21 (0.79-7.63) cm,
343 p=0.016). The C/C genotype in 501AC was associated with higher waist circumference
344 (C/C: 99.21 (2.07) vs A/A+A/C 95.17 (0.65) cm, difference adjusted for age and BMI
345 3.59 (0.77-6.40), p=0.013). No significant association was found with COB. Total
346 cholesterol and LDL cholesterol were associated with -604GA and -501AC
347 polymorphisms (table 6). Carriers of A/A genotype in -604GA presented lower levels of
348 total cholesterol (A/A: 210.98 (2.87) vs A/G-G/G 220.77 (2.42), difference in mean (CI:
349 95%) 9.79 (1.71-17.87), p=0.018, adjusted for age and BMI, p=0.082) and lower levels
350 of LDL-cholesterol (A/A: 123.47 (2.77) vs A/G-G/G 132.08 (2.12), difference in mean
351 (CI: 95%) 8.60 (1.36-15.84), p=0.020, adjusted for age and BMI, p=0.049). Carriers of
352 the C/C genotype in -501AC presented lower levels of total cholesterol (C/C: 207.75
353 (4.57) vs A/A-A/C 219.09 (2.06), difference in mean (CI: 95%) 11.34 (0.49-23.16),
354 p=0.061, adjusted for age and BMI, p=0.074) and lower levels of LDL-cholesterol
355 (C/C: 121.66 (4.36) vs A/A-A/C 130.52 (1.84), difference in mean (CI: 95%) 8.76
356 (1.75-19.47) cm, p=0.10, adjusted for age and BMI, p=0.035). No association was
357 found with glucose levels, diabetes, hypertension or MS.

358 **Discussion**

359

360 The association between ghrelin polymorphisms and MS components has been a matter
361 of interest in recent years. However, little is known about this relationship in the elderly
362 population. In the present study, we investigated whether ghrelin gene polymorphisms
363 were related to MS components in elderly Caucasian subjects participating in the
364 Mataró and the Río Hortega Studies, both conducted in Spain [22,23]. We did not find
365 any relationship between fasting total plasma ghrelin concentrations and the six SNPs
366 studied; similar results have also been reported by other authors [28,29] in relation to
367 total and acetylated ghrelin concentrations and M72L and L90G. Ukkola [30] found
368 lower levels of ghrelin in Arg51Gln subjects. Unfortunately, we did not measure
369 acetylated ghrelin, which is known to be the accepted active ghrelin form of the peptide
370 responsible for its cardiometabolic actions. Functional consequences of the variants of
371 the six SNPs are still unknown; variants of -604CT (located in the promoter region of
372 the ghrelin gene) and M72L (between mature ghrelin and obestatin) are not associated
373 with changes in mature ghrelin, but these variants may modulate protein processing or
374 mRNA stability, and may modify secretion or activity of ghrelin. L90G variants have
375 been related to changes in the obestatin peptide, but its possible consequences have not
376 been elucidated. Recent studies have found that -994CT [30], as well as M72L and -
377 604CT influence the expression of the ghrelin gene, but L90G does not [17].

378

379 We found an association between the -604GA polymorphism with COB, total and LDL
380 cholesterol in all subjects. In men, we found an association with COB and MS (IDF
381 criteria), while in women it was associated only with total and LDL-cholesterol.
382 Polymorphism -501AC was associated with BMI, LDL-cholesterol and triglycerides in
383 all subjects. In women, -501AC was associated with waist circumference, overweight,
384 total cholesterol and LDL-cholesterol.

385

386 R51Q presented an association with being overweight in all subjects and was associated
387 with waist circumference in men. M72L was associated with COB in all subjects and in
388 men, it was associated with MS. L90G was associated with waist circumference in
389 women. Haplotype analysis also confirmed the influence of ghrelin polymorphisms in
390 some MS components, particularly waist circumference and central obesity, in which

391 SNPs haplotype 4 showed a strong risk effect. All these data may indicate the importance
392 of ghrelin polymorphisms in anthropometric data and with parameters related to lipid
393 profile while there is no influence on other parameters such as glucose metabolism or
394 blood pressure. In addition, these associations are influenced by gender as some of them
395 are only present in men or in women. In any case, these results should be interpreted
396 cautiously due to the size of our sample study and their low frequency of appearance.

397

398 Other authors have found different results when evaluating MS components and ghrelin
399 SNPs and little data is available in relation to -501AC ghrelin SNP. Hubacek et al [31]
400 studied the association between this SNP and BMI but no significant association was
401 found. Other SNPs have been studied in relation to obesity and BMI, especially M72L,
402 some with a positive association [29,32,33] and others with no relationship [34]. In our
403 male sample, A/C genotype in M72L presented higher prevalence of central obesity and
404 in our female sample, A/A genotype in L90G was associated with higher waist
405 circumference. Similar data have been reported in relation to lipid profile, where M72L
406 has been associated with differences in HDL [16,35] and triglycerides [35] and no
407 association with lipid profile has been reported for -501AC [35,36] or R51Q [35].

408

409 Several studies have found a protector role of M72L for diabetes [37-39], which can be
410 associated with an effect on insulin resistance, increasing its sensibility [17,32], while
411 others have found no association [40,41]. In our sample, we have not found any
412 association with diabetes or glucose levels.

413

414 No association between the five studied SNPS and hypertension was found in our
415 subjects. However other reports have described significant associations with -604G/A, -
416 501 A/C, L90G and M72L [42] and -501 A/C [37].

417

418 In relation to MS, carriers of the A/A genotype in -604GA and the A/C genotype in
419 M72L presented a higher prevalence of central obesity and MS according to IDF
420 criteria, but this association was only observed in men. Contradictory results have been
421 previously reported: for example an association between M72L and MS [16,21] and no
422 association [19,43].

423

424 Our study has several limitations. It is a population-based study where non-
425 institutionalized individuals were selected. However, if we had included younger
426 subjects we would have avoided the over-representation of certain genotypes because of
427 survival bias. The amount of subjects that were finally included was also restricted to
428 the recruitment possibilities in the specific geographical areas involved in the study; a
429 stronger statistical power would have probably been possible with a higher number of
430 participants, especially in low frequency polymorphisms. Moreover, the measurement
431 of acetylated and desacetylated ghrelin rather than total ghrelin, as well as obestatin,
432 would have helped to explore potential relationships not found with our current design.
433 Finally, the high prevalence of central obesity and MS according to IDF criteria in our
434 subjects may have also contributed to a bias [44].

435

436 In conclusion, in our cohort of aged Spanish-dwelling individuals, Ghrelin gene variants
437 are associated with certain components of MS, in particular with central obesity and
438 hypertension.

439

440

441 **Fundings:** This work was supported by Fondo Investigaciones Sanitarias Grants
442 07/0601 and PI11/00726, by *CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas*
443 *Relacionadas* (CIBERDEM); CIBERDEM is an initiative by Carlos III Health Institute
444 in Madrid and the Spanish Health Ministry, by PROMETEO/2009/029, AP-091/11, and
445 ACOMP/2013/039 from the Valencian Government.

446

447 **Acknowledgements:** Special thanks to Nicola Van Berckel for her English version of
448 the manuscript and Harvey Evans for her editing. The Mataró Aging Study Group:
449 Ayllón J, Buquet X, Bosch A, Burdoy E, Cadenas I, Dordas J, Espinosa C, Falcón I,
450 Gordillo M, Merino MJ, Mussoll J, Palomera E, Papiol M, Pous E, Pubill M, Puig J,
451 Puig-Domingo M (Project co-director), Sanahuja J, Serra P, Serra-Prat M (Project co-
452 director), Serrano C, Vilardebò A, Villarroya I.

453

454

455 **Conflict of interest:** The authors have nothing to declare in relation to this article.

Reference List

456
457
458
459
460

1. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194-198.

461
462
463

2. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR (2001) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5992.

464
465
466
467

3. Rigamonti AE, Pincelli AI, Corra B, Viarengo R, Bonomo SM, Galimberti D, Scacchi M, Scarpini E, Cavagnini F, Muller EE (2002) Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol* 175: R1-R5.

468
469
470

4. Serra-Prat M, Palomera E, Clave P, Puig-Domingo M (2009) Effect of age and frailty on ghrelin and cholecystokinin responses to a meal test. *Am J Clin Nutr* 89: 1410-1417.

471
472
473

5. Serra-Prat M, Fernandez X, Burdoy E, Mussoll J, Casamitjana R, Puig-Domingo M (2007) The role of ghrelin in the energy homeostasis of elderly people: a population-based study. *J Endocrinol Invest* 30: 484-490.

474
475
476

6. Bertoli S, Magni P, Krogh V, Ruscica M, Dozio E, Testolin G, Battezzati A (2006) Is ghrelin a signal of decreased fat-free mass in elderly subjects? *Eur J Endocrinol* 155: 321-330.

477
478
479
480
481

7. Sturm K, MacIntosh CG, Parker BA, Wishart J, Horowitz M, Chapman IM (2003) Appetite, food intake, and plasma concentrations of cholecystokinin, ghrelin, and other gastrointestinal hormones in undernourished older women and well-nourished young and older women. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3747-3755.

482
483
484

8. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2000) Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 279(3):909-13.

485
486
487

9. Chen CY, Asakawa A, Fujimiya M, Lee SD, Inui A (2009) Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol Rev* 61,430-481.

488
489
490

10. Ukkola O, Poykko SM, Antero KY (2006) Low plasma ghrelin concentration is an indicator of the metabolic syndrome. *Ann Med* 38: 274-279.

491
492
493
494

11. Serra-Prat M, Alfaro SR, Palomera E, Casamitjana R, Buquet X, Fernandez-Fernandez C, Puig-Domingo M (2009) Relationship between ghrelin and the metabolic syndrome in the elderly: a longitudinal population-based study. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 70, 227-232.

- 495 12. Rodriguez A, Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Gil MJ, Becerril S, Sainz N,
496 Silva C, Salvador J, Colina I, Fruhbeck G (2009) Acylated and desacyl
497 ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes.
498 *Int.J.Obes.(Lond)* **33**, 541-552.
- 499 13. St-Pierre DH, Karelis AD, Coderre L, Malita F, Fontaine J, Mignault D,
500 Brochu M, Bastard JP, Cianflone K, Doucet E, Imbeault P, Rabasa-Lhoret
501 R (2007) Association of acylated and nonacylated ghrelin with insulin
502 sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin*
503 *Endocrinol Metab* **92**, 264-269
- 504 14. Barazzoni R, Zanetti M, Ferreira C, Vinci P, Pirulli A, Mucci M, Dore F,
505 Fonda M, Ciochi B, Cattin L, Guarnieri G (2007) Relationships between
506 desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic
507 syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 3935-3940.
- 508 15. Garcia EA, King P, Sidhu K, Ohgusu H, Walley A, Lecoer C,
509 Gueorguiev M, Khalaf S, Davies D, Grossman AB, Kojima M, Petersenn
510 S, Froguel P, Korbonits M (2009) The role of ghrelin and ghrelin-receptor
511 gene variants and promoter activity in type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*
512 **161**: 307-315.
- 513 16. Steinle NI, Pollin TI, O'Connell JR, Mitchell BD, Shuldiner AR (2005)
514 Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the
515 Old Order Amish. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 6672-6677.
- 516 17. Zavarella S, Petrone A, Zampetti S, Gueorguiev M, Spoletini M, Mein CA,
517 Leto G, Korbonits M, Buzzetti R (2008) A new variation in the promoter
518 region, the -604 C>T, and the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene
519 are associated with protection to insulin resistance. *Int.J.Obes.(Lond)* **32**,
520 663-668.
- 521 18. Zhang JV, Ren PG, Vasan-Kretschmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C,
522 Hsueh AJ (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene,
523 opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* **310**, 996-999.
- 524 19. Bing C, Ambye L, Fenger M, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S,
525 Urhammer SA (2005) Large-scale studies of the Leu72Met polymorphism
526 of the ghrelin gene in relation to the metabolic syndrome and associated
527 quantitative traits. *Diabet Med* **22**: 1157-1160.
- 528 20. Li WJ, Zhen YS, Sun K, Xue H, Song XD, Wang YB, Fan XH, Han YF,
529 Hui RT (2008) Ghrelin receptor gene polymorphisms are associated with
530 female metabolic syndrome in Chinese population. *Chin Med J (Engl)* **121**:
531 1666-1669.
- 532 21. Xu LL, Xiang HD, Qiu CC, Xu Q (2008) Association of ghrelin
533 polymorphisms with metabolic syndrome in Han Nationality Chinese.
534 *Biomed Environ Sci* **21**: 188-192.

- 535 22. Puig-Domingo M, Serra-Prat M, Merino MJ, Pubill M, Burdoy E, Papiol
536 M (2008) Muscle strength in the Mataro aging study participants and its
537 relationship to successful aging. *Aging Clin Exp Res* 20: 439-446.
- 538 23. Mena-Martin FJ, Martin-Escudero JC, Simal-Blanco F, Carretero-Ares JL,
539 rzua-Mouronte D, Herreros-Fernandez V (2003) Health-related quality of
540 life of subjects with known and unknown hypertension: results from the
541 population-based Hortega study. *J Hypertens* 21: 1283-1289.
- 542 24. Mora M, Mansego ML, Serra-Prat M, Palomera E, Boquet X, Chaves JF,
543 Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group (2014). Glucose
544 impairment and ghrelin gene variants are associated to cognitive
545 dysfunction. *Aging Clin Exp Res*. 2014 Apr;26(2):161-9
546
- 547 25. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J (2006) Metabolic syndrome--a new world-
548 wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes
549 Federation. *Diabet Med* 23: 469-480.
- 550 26. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and
551 for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386.
- 552 27. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web
553 tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22: 1928-1929.
- 554 28. Ando T, Ichimaru Y, Konjiki F, Shoji M, Komaki G (2007) Variations in
555 the preproghrelin gene correlate with higher body mass index, fat mass,
556 and body dissatisfaction in young Japanese women. *Am J Clin Nutr* 86:
557 25-32.
- 558 29. Vivenza D, Rapa A, Castellino N, Bellone S, Petri A, Vacca G, Aimaretti
559 G, Broglio F, Bona G (2004) Ghrelin gene polymorphisms and ghrelin,
560 insulin, IGF-I, leptin and anthropometric data in children and adolescents.
561 *Eur J Endocrinol* 151: 127-133.
- 562 30. Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Perusse L, Rankinen T, Tschop M,
563 Heiman ML, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Sjostrom L,
564 Bouchard C (2002) Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on
565 three different studies. *Obes Res* 10: 782-791.
- 566 31. Hubacek JA, Adamkova V, Bohuslavova R, Suchanek P, Poledne R,
567 Lanska V (2008) No significant association between A-501C single
568 nucleotide polymorphism in preproghrelin and body mass index or waist-
569 to-hip ratio in central European population. *Metabolism* 57: 1016-1017.
- 570 32. Korbonits M, Gueorguiev M, O'Grady E, Lecoer C, Swan DC, Mein CA,
571 Weill J, Grossman AB, Froguel P (2002) A variation in the ghrelin gene
572 increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. *J*
573 *Clin Endocrinol Metab* 87: 4005-4008.

- 574 33. Miraglia del GE, Santoro N, Cirillo G, Raimondo P, Grandone A,
575 D'Aniello A, Di NM, Perrone L (2004) Molecular screening of the ghrelin
576 gene in Italian obese children: the Leu72Met variant is associated with an
577 earlier onset of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 447-450.
- 578 34. Zhu JF, Liang L, Zou CC, Fu JF (2010) Plasma ghrelin levels and
579 polymorphisms of ghrelin gene in Chinese obese children and adolescents.
580 *Ir J Med Sci* 179: 345-349.
- 581 35. Hubacek JA, Bohuslavova R, Skodova Z, Adamkova V (2007) Variants
582 within the ghrelin gene--association with HDL-cholesterol, but not with
583 body mass index. *Folia Biol (Praha)* 53: 202-206.
- 584 36. Martin GR, Loreda JC, Sun G (2008) Lack of association of ghrelin
585 precursor gene variants and percentage body fat or serum lipid profiles.
586 *Obesity (Silver Spring)* 16: 908-912.
- 587 37. Berthold HK, Giannakidou E, Krone W, Tregouet DA, Gouni-Berthold I
588 (2010) Influence of ghrelin gene polymorphisms on hypertension and
589 atherosclerotic disease. *Hypertens Res* 33: 155-160.
- 590 38. Liao N, Xie ZK, Huang J, Xie ZF (2013) Association between the ghrelin
591 Leu72Met polymorphism and type 2 diabetes risk: a meta-analysis. *Gene*
592 517: 179-183.
- 593 39. Mager U, Lindi V, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H,
594 Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto J, Laakso M,
595 Pulkkinen L, Uusitupa M (2006) Association of the Leu72Met
596 polymorphism of the ghrelin gene with the risk of Type 2 diabetes in
597 subjects with impaired glucose tolerance in the Finnish Diabetes
598 Prevention Study. *Diabet Med* 23: 685-689.
- 599 40. Choi HJ, Cho YM, Moon MK, Choi HH, Shin HD, Jang HC, Kim SY, Lee
600 HK, Park KS (2006) Polymorphisms in the ghrelin gene are associated
601 with serum high-density lipoprotein cholesterol level and not with type 2
602 diabetes mellitus in Koreans. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4657-4663.
- 603 41. Liu J, Liu J, Tian LM, Liu JX, Bing YJ, Zhang JP, Wang YF, Zhang LY
604 (2012) Association of ghrelin Leu72Met polymorphism with type 2
605 diabetes mellitus in Chinese population. *Gene* 504: 309-312.
- 606 42. Mager U, Kolehmainen M, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT,
607 Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto
608 JO, Pulkkinen L, Uusitupa MI (2006) Association between ghrelin gene
609 variations and blood pressure in subjects with impaired glucose tolerance.
610 *Am J Hypertens* 19: 920-926.
- 611 43. Zhu JF, Liang L, Zou CC, Fu JF (2010) Plasma ghrelin levels and
612 polymorphisms of ghrelin gene in Chinese obese children and adolescents.
613 *Ir J Med Sci* 179: 345-349.
614

615 44. Mora M, Granada ML, Roca M, Palomera E, Puig R, Serra-Prat M, Puig-
616 Domingo M (2013) Obestatin does not modify weight and nutritional
617 behavior but is associated with metabolic syndrome in old women. Clin.
618 Endocrinol. (Oxf) 78, 882-890.
619
620
621
622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642 **FIGURE LEGENDS:**

643

644 Table 1: Characteristics of the individuals by population.

645

646 Supplementary Table 1. A) Prevalence of the genotypes in whole sample and by gender.

647 B) Linkage disequilibrium of the polymorphisms analyzed in our population measured

648 by D' statistic.

649

650 Table 2. Ghrelin polymorphisms and their association with waist, central obesity, BMI
651 and obesity as defined by IDF.

652

653 Table 3. Haplotype association in relation to waist, BMI, central obesity and obesity.

654

655 Table 4. Ghrelin polymorphisms association with total cholesterol, LDL-cholesterol,
656 HDL-cholesterol and triglycerides.

657

658 Table 5. Ghrelin polymorphism associations in men.

659

660 Table 6. Ghrelin polymorphism associations in women.

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674 Table 1: Characteristics of the individuals by population.
675

	Whole sample	Mataró (n=310)	Valladolid (n=514)	p	Men	Women	p
Age (years)	77.31±5.04	76.99±5.92	77.49±4.43	0.201	77.24±4.85	77.38±5.22	0.684
BMI (kg/m ²)	28.01±4.19	28.10±4.14	27.94±4.22	0.590	27.28±3.56	28.73±4.63	<0.001
Systolic BP (mmHg)	144.91±22.52	142.25±23.02	146.49±22.10	0.009	142.94±21.10	146.92±23.75	0.011
Diastolic BP (mmHg)	80.94±11.99	80.55±12.62	81.17±11.60	0.479	80.13±11.87	81.76±12.07	0.053
Hypertension n (%)	593 (72.7)	202 (66.4)	391 (76.4)	0.002	289 (70.1)	304 (75.2)	0.102
TC (mg/dl)	209.00±37.80	210.68±37.85	208.02±7.81	0.338	200.19±35.92	217.84±37.63	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	169.37±97.95	128.07±75.11	192.95±101.66	<0.001	177.16±104.90	161.56±9.91	0.024
LDL-cholesterol (mg/dL)	123.07±34.30	129.50±33.94	119.38±34.02	<0.001	116.54±33.67	129.61±33.72	<0.001
HD-cholesterol (mg/dL)	51.78±13.09	54.79±12.71	50.05±13.17	<0.001	47.95±11.72	55.61±13.48	<0.001
Glucose (mg/dL)	101.85±25.85	107.33±27.69	98.770±24.26	<0.001	102.89±27.70	100.80±23.84	0.252
Diabetes n (%)	114 (13.9)	65 (21.2)	49 (9.6)	<0.001	56 (13.6)	58 (14.2)	0.796
Waist perimeter (cm)	98.35±11.16	101.93±9.96	96.15±11.29	<0.001	100.80±9.49	95.80±12.15	<0.001
Central obesity (IDF criteria) n (%)	676 (84.1)	282 (92.5)	394 (79.0)	<0.001	320 (89.9)	356 (89.9)	<0.001
MS n (%)	585 (74.1)	213 (74.0)	372 (74.3)	0.928	84 (54.9)	98 (61.0)	0.293

676

677 Values are mean ± standard deviation TC: total cholesterol; BMI: body mass index, BP: blood pressure; MS: metabolic syndrome by IDF
678 criteria.

679

680

681
682
683
684

Supplementary Table 1. A) Prevalence of the genotypes in whole sample and by gender. B) Linkage disequilibrium of the polymorphisms analyzed in our population measured by D' statistic.

A)

SNPs Pol.	Genotypes All sample			Genotypes Women			Genotypes Men		
	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T
-994CT rs 26312	80%	19%	1%	78%	21%	1%	81%	18%	1%
-604GA rs27647	A/A 30%	G/A 54%	G/G 16%	A/A 30%	G/A 56%	G/G 14%	A/A 31%	G/A 52%	G/G 17%
-501AC rs 26802	A/A 41%	C/A 49%	C/C 10%	A/A 36%	C/A 53%	C/C 11%	A/A 45%	C/A 46%	C/C 9%
R51Q rs34911341	G/G 99%	G/A 1%	-	G/G 99%	G/A 1%	-	G/G 99%	G/A 1%	-
M72L rs696217	C/C 85%	C/A 15%	-	C/C 84%	C/A 16%	-	C/C 87%	C/A 13%	-
L90G rs4684677	A/A 93%	A/T 7%	-	A/A 93%	A/T 7%	-	A/A 92%	A/T 8%	-

B)

D' statistic	-994CT	-604GA	-501AC	R51Q	M72L	L90G
-994CT						
-604GA	0.9129		0.3785	0.8753	0.9022	0.3013
-501AC			0.8342	0.7355	0.9985	0.895
R51Q				0.9623	0.2683	0.8504
M72L					0.2201	0.1605
L90G						0.1747

Table 2. Ghrelin polymorphisms and their association with waist, central obesity, BMI and obesity as defined by IDF.

SNPs	Model	Waist (cm)		Difference (95% CI) (cm)	P-value	P-value adjusted*	CENTRAL OBESITY		OR (95% CI)	P-value	P-value adjusted*
		Genotype (N)	Mean (SD)				COB (%)	No COB (%)			
-994CT rs26312	Dominant	C/C (n=620)	98.47 (0.44)	0.00	0.33	0.36	518 (79)	102 (81.6)	1.00	0.50	0.52
		C/T- T/T (n=161)	97.51 (0.94)	-0.96 (-2.90-0.97)			138 (21)	23 (18.4)			
-604GA rs27647	Dominant	A/A (n=237)	98.89 (0.74)	0.00	0.28	0.19	207 (31.6)	30 (23.8)	1.00	0.074	0.045
		G/A- G/G (n=543)	97.94 (0.48)	-0.94 (-2.66-0.77)			447 (68.3)	96 (76.2)			
-501AC rs26802	Dominant	A/A- (n=311)	98.37 (0.04)	0.00	0.780	0.460	256	56 (44.4)	1.00	0.27	0.78
		A/C- C/C (n=468)	98.14 (0.52)	-0.23 (-1.84-1.38) -0.42 (-1.53-0.70)			(39.1)	70 (55.6)			
R51Q	--	G/G (n=784)	98.17 (0.41)	0.00	0.89	0.93	635 (98.8)	125 (99.2)	1.00	0.65	0.91
		G/A (n=9)	98.67 (4.26)	0.50 (-6.88-7.88)			8 (1.2)	1 (0.8)			
M72L rs696217	Dominant	C/C (n=654)	98.13 (0.46)	0.00	0.73	0.75	538 (83.5)	116 (92.1)	1.00	0.009	0.005
		C/A- A/A (n=116)	98.52 (1.03)	0.39 (-1.83-2.61)			106 (16.5)	10 (7.9)			
L90G rs4684677	--	A/A (n=724)	98.39 (0.41)	0.00	0.34	0.16	611 (92.9)	113 (90.4)	1.00	0.35	0.22
		A/T (n=59)	96.95 (1.74)	-1.44 (-4.41 - 1.53)			47 (7.1)	12 (9.6)			
SNPs	Model	BMI (kg/m2)		Difference (95% CI) (cm)	P-value	P-value adjusted#	OBESITY		OR (95% CI)	P-value	P-value adjusted#
		Genotype (N)	Mean (SD)				OB (%)	No OB (%)			
-994CT rs26312	Dominant	C/C (n=608)	28.02 (0.17)	0.00	0.77	0.72	209 (80.7)	415 (78.6)	1.00	0.49	0.49
		C/T- T/T (n=163)	27.91 (0.33)	--0.11 (-0.83-0.62)			50 (19.3)	113 (21.4)			
-604GA rs27647	Dominant	A/A (n=232)	28.17 (0.74)	0.00	0.36	0.35	77 (30.0)	161 (30.5)	1.00	0.88	1
		G/A- G/G (n=538)	27.87 (0.18)	-0.30 (-0.94-0.34)			180 (70.0)	367 (69.5)			
-501AC rs26802	Dominant	A/A (n=312)	27.58(0.23)	0.00	0.031	0.076	219 (41.6)	97 (37.6)	1.00	0.29	0.43
		A/C- C/C (n=458)	28.24(0.20)	0.66 (0.06-1.26) 0.54 (-0.05-1.14)#			308 (58.4)	161(62.4)			
R51Q	--	G/G (n=750)	27.98 (0.15)	0.00	0.96	1	248(98.0)	517 (99.2)	1.00	0.16	0.13
		G/A (n=9)	27.88 (0.91)	-0.08 (-2.81-2.65)			5 (2.0)	4 (0.8)			
M72L rs696217	Dominant	C/C (n=644)	27.93 (0.16)	0.00	0.72	0.86	216 (85.4)	443 (84.9)	1.00	0.85	0.77
		C/A-AA (n=116)	28.08 (0.40)	0.15 (-0.67-0.97)			37 (14.65)	79 (15.1)			

L90G rs4684677	--	A/A (n=716) A/T (n=57)	27.96 (0.16) 28.24 (0.56)	0.00 0.28 (-0.85 - 1.40)	0.63	0.60	238 (91.9) 492 (93.0) 21 (8.1) 37 (7.0%)	1.00 1.17 (0.67-2.05)	0.58	0.50
-------------------	----	---------------------------	------------------------------	-----------------------------	------	------	---	--------------------------	------	------

686
687 BMI: body mass index. COB: Central obesity; OB: obesity. *Adjusted for age, gender and BMI. #Adjusted for age and gender. N: number; SD:
688 standard deviation.
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713

714
715
716

Table 3. Haplotype association in relation to waist, BMI, central obesity and obesity.

	-994CT		-604AG		-501AC		R51Q		M72L		L90Q		Frequency		WAIST		COB		BMI		OB		P-value
	C	C	G	A	A	C	G	G	C	C	A	A	0.3846	Difference (95% CI)*	P-value*	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value		
1	C	C	G	A	A	C	G	G	C	C	A	A	0.3846	0.00	---	1.00	---	0.00	---	1.00	---	---	
2	C	C	A	C	C	C	G	G	C	C	A	A	0.2879	0.68 (-0.32 - 1.69)	0.18	1.12 (0.72 - 1.75)	0.62	0.45 (-0.08 - 0.99)	0.098	1.24 (0.87 - 1.77)	0.098	0.24	
3	C	C	A	A	A	C	G	G	C	C	A	A	0.1400	0.75 (-0.51 - 2.01)	0.24	1.59 (0.90 - 2.81)	0.11	0.09 (-0.59 - 0.77)	0.8	1.33 (0.83 - 2.11)	0.8	0.23	
4	T	A	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A	0.0526	2.08 (0.16 - 4.00)	0.034	3.42 (1.26 - 9.31)	0.016	0.01 (-1.06 - 1.08)	0.98	2.33 (0.98 - 5.50)	0.98	0.055	
5	C	C	A	A	A	C	G	G	C	C	T	T	0.0301	-1.50 (-3.91 - 0.91)	0.22	0.66 (0.23 - 1.87)	0.44	0.71 (-0.6 - 2.02)	0.29	0.76 (0.34 - 1.68)	0.29	0.5	
6	C	C	G	C	C	C	G	G	C	C	A	A	0.0247	2.45 (-0.52 - 5.41)	0.11	1.84 (0.44 - 7.72)	0.4	-0.97 (-2.59 - 0.66)	0.24	0.92 (0.32 - 2.65)	0.24	0.88	
7	T	A	A	C	C	A	G	G	A	A	A	A	0.0173	-3.05 (-6.81 - 0.71)	0.11	3.52 (0.35 - 34.98)	0.28	0.60 (-1.33 - 2.53)	0.54	3.29 (0.51 - 21.39)	0.54	0.21	
8	T	A	A	A	A	C	G	G	C	C	A	A	0.0142	-0.27 (-4.39 - 3.85)	0.9	1.55 (0.21 - 11.39)	0.67	-0.5 (-2.48 - 1.48)	0.62	1.12 (0.28 - 4.55)	0.62	0.87	
9	T	A	A	C	C	C	G	G	C	C	A	A	0.0117	-2.58 (-6.80 - 1.64)	0.23	0.67 (0.08 - 5.33)	0.71	1.41 (-1.04 - 3.86)	0.26	1.61 (0.32 - 8.18)	0.26	0.56	
rare	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.0370	-0.60 (-3.26 - 2.07)	0.66	0.48 (0.18 - 1.27)	0.14	-0.15 (-1.54 - 1.24)	0.83	0.74 (0.32 - 1.70)	0.83	0.48	

COB: Central obesity; BMI: body mass index; OB: obesity. Waist and COB data have been adjusted for age, sex and BMI; BMI and OB data have been adjusted for age and sex.

717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734

Table 4. Ghrelin polymorphisms association with total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides.

SNPs	Model	TC (mg/dL)		Difference (95% CI)	P-value adjusted*	LDL-C (mg/dL)		Difference (95% CI)	P-value adjusted*
		Genotype (N)	Mean (SD)			Genotype (N)	Mean (SD)		
-994CT rs26312	Dominant	C/C (n=632)	208.40 (1.50)	0.00 2.82 (-3.74-9.37)	0.40	C/C (n=632)	122.42 (1.36)	0.00 2.91 (-3.03-8.84)	0.34
		C/T- T/T (n=162)	211.22 (3.06)			C/T- T/T (n=162)	125.33 (2.76)		
-604GA rs27647	Dominant	A/A (n=243)	204.72 (2.25)	0.00 6.14 (0.42-11.86)	0.036	A/A (n=243)	119.45 (2.07)	0.00 5.19 (0.02-10.37)	0.05
		G/A- G/G (n=550)	210.25 (1.43)			G/A- G/G (n=550)	124.65 (1.50)		
-501AC rs26802	Dominant	A/A (n=320)	210.80 (2.18)	0.00 -2.93 (-8.31-2.46)	0.29	A/A (n=320)	126.11 (2.00)	0.00 -4.98 (-9.85- -0.11)	0.045
		A/C- C/C (n=473)	207.87 (1.71)			A/C- C/C (n=473)	121.13 (1.53)		
R51Q	--	G/G (n=773)	208.88 (1.37)	0.00 -8.77 (-33.68-16.14)	0.49	G/G (n=773)	123.15 (1.24)	0.00 -13.93 (-36.52-8.67)	0.23
		G/A (n=9)	200.11 (7.75)			G/A (n=9)	109.22 (7.28)		
M72L rs696217	Dominant	C/C (n=667)	208.47 (1.45)	0.00 2.03 (-5.44-9.50)	0.59	C/C (n=667)	122.65 (1.31)	0.00 2.17 (-4.61-8.95)	0.74
		C/A- A/A (n=116)	200.11 (7.75)			C/A- A/A (n=116)	124.82 (3.48)		
L90G rs4684677	--	A/A (n=737)	208.56 (1.40)	0.00 4.32 (-5.71- 14.35)	0.40	A/A (n=737)	122.55 (1.26)	0.00 5.12 (-3.97-14.20)	0.27
		A/T (n=59)	212.88 (4.64)			A/T (n=59)	127.66 (4.35)		

SNPs	Model	HDL-C (mg/dL)		Difference (95% CI)	P-value adjusted*	TG (mg/dL)		Difference (95% CI)	P-value adjusted*
		Genotype (N)	Mean (SD)			Genotype (N)	Mean (SD)		
-994CT rs26312	Dominant	C/C (n=632)	51.66 (0.52)	0.00 1.02 (-1.25-3.29)	0.38	C/C (n=632)	169.67 (3.99)	0.00 -3.19 (-20.10-13.71)	0.71
		C/T- T/T (n=1624)	52.68 (1.09)			C/T- T/T (n=162)	166.48 (6.88)		
-604GA rs27647	Dominant	A/A (n=243)	51.92 (0.84)	0.00 -0.14 (-2.12-1.84)	0.89	A/A (n=243)	167.09 (6.49)	0.00 2.83 (-11.97-17.63)	0.71
		G/A- G/G (n=550)	51.78 (0.56)			G/A- G/G (n=550)	169.92 (4.12)		
-501AC rs26802	Dominant	A/A (n=320)	52.11 (0.76)	0.00 -0.50 (-2.36-1.36)	0.60	A/A (n=320)	161.68 (5.29)	0.00 12.49 (-1.38-26.37)	0.07
		A/C- C/C (n=473)	51.60 (0.59)			A/C- C/C (n=473)	174.17 (4.59)		
R51Q	--	G/G (n=773)	51.87 (0.47)	0.00 0.91 (-7.72-9.55)	0.84	G/G (n=773)	167.87 (3.51)	0.00 22.68 (-41.39-86.76)	0.49
		G/A (n=9)	52.78 (4.13)			G/A (n=9)	190.56 (30.77)		
M72L rs696217	Dominant	C/C (n=667)	51.69 (0.51)	0.00 1.32 (-1.27-3.91)	0.32	C/C (n=667)	168.87 (3.86)	0.00 -4.82 (-235.36- 146.94)	0.62
		C/A- A/A (n=116)	53.01 (1.20)			C/A- A/A (n=116)	164.05 (7.79)		
L90G rs4684677	--	A/A (n=743)	51.88 (0.48)	0.00 -0.87 (-4.35-2.62)	0.63	A/A (n=737)	169.10(3.62)	0.00 2.22 (-23.74- 28.19)	0.87
		A/T (n=60)	51.02 (1.70)			A/T (n=59)	171.32 (12.33)		

*Adjusted for age, gender, dyslipemic treatment and BMI. BMI: body mass index. N: number; SD: standard deviation.

Table 5. Ghrelin polymorphism associations in men.

SNPs	Model	Genotype (N)	Waist (cm)		Difference (95% CI) (cm)	P-value	P-value adjusted*	CENTRAL OBESITY		OR (95% CI)	P-value	P-value adjusted*
			Mean (SD)	COB (%)				No COB				
-994CT rs26312	Dominant	C/C (n=321)	100.53		0.00	0.37	0.51	250 (80.1)	71 (82.6)	1.00	0.61	0.65
		C/T- T/T (n=77) (1.28)	101.61		1.08 (-1.28-3.45)			62 (19.9)	15 (17.4)	1.17 (0.63-2.19)		
-604GA rs27647	Dominant	A/A (n=122)	101.05		0.00	0.67	0.28	103 (33.0)	19 (22.1)	1.00	0.047	0.02
		G/A- G/G (n=276) (0.85)	100.61 (0.58)		-0.44 (-2.46-1.59)			209 (67.0)	67 (77.9)	0.58 (0.33-1.01) 0.44 (0.22-0.90)*		
-501AC rs26802	Dominant	A/A- (n=179)	100.44		0.00	0.55	0.70	140 (45.0)	39 (45.4)	1.00	0.96	0.31
		A/C- C/C (n=218) (0.65)	101.01		0.58 (-1.30-2.46)			171 (55.0)	47 (54.6)	1.01 (0.63-1.84)		
R51Q	--	G/G (n=385)	100.63		0.00	0.086	0.043	303 (98.4)	86 (100)	1.00	0.12	0.16
		(0.48) G/A (n=5) (2.68)	108.00		7.37 (-1.01-15.75) 5.57 (0.18-10.96)*			5 (1.6)	0 (0.0)	NA		
M72L rs696217	--	C/C (n=343)	100.59		0.00	0.41	0.12	264 (85.4)	79 (91.9)	1.00	0.10	0.023
		(0.50) C/A (n=52) (1.60)	101.77		1.18 (-1.60-3.96)			45 (14.6)	7 (8.1)	1.95 (0.83-4.43) 3.03 (1.10-8.40)*		
L90G rs4684677	--	A/A (n=368)	100.61		0.00	0.32	0.41	288 (92.0)	80 (93.0)	1.00	0.75	0.87
		(0.50) A/T (n=31) (1.57)	102.39		1.78 (-1.70 - 5.25)			25 (8.0)	6 (7.0)	1.16 (0.46-2.92)		

* Adjusted for age and BMI. NA: not available. BMI: body mass index. N: number; SD: standard deviation.

Table 6. Ghrelin polymorphisms association in women.

SNPs	Model	Waist (cm)		Difference (95% CI) (cm)	P-value	P-value adjusted ^d *	CENTRAL OBESITY		OR (95% CI)	P-value	P-value adjusted*
		Genotype (N)	Mean (SD)				COB (%)	No COB			
-994CT rs26312	Dominant	C/C (n=298)	96.26 (0.72)	0.00	0.095	0.14	268 (77.9)	31 (79.5)	1.00	0.82	0.71
		C/T- T/T (n=84)	93.75 (1.23)	-2.51 (-5.46-0.43)			76 (22.1)	8 (20.5)	1.10 (0.49-2.49)		
-604GA rs27647	Dominant	A/A (n=115)	96.59 (1.19)	0.00	0.30	0.34	104 (30.4)	11 (27.5)	1.00	0.70	0.73
		G/A- G/G (n=266)	97.17 (0.73)	-1.42 (-4.10-1.26)			238 (69.6)	29 (72.5)	0.87 (0.42-1.80)		
-501AC rs26802	Recessive	A/A-A/C- (n=340)	95.17 (0.65)	0.00	0.043	0.013	116 (33.8)	17 (42.5)	1.00	0.28	0.053
		C/C (n=42)	99.21 (2.07)	4.05 (0.15-7.95) 3.59 (0.77-6.40)*			227 (66.2)	23 (57.5)	1.45 (0.74-2.81) 1.30 (0.57-2.95)*		
R51Q	--	G/G (n=371)	95.58 (0.63)	0.00	0.16	0.16	332 (99.1)	39 (97.5)	1.00	0.42	0.26
		G/A (n=4)	87.00 (3.87)	-8.58 (-20.60-3.44)			3 (0.9)	1 (2.5)	0.35 (0.04-3.47)		
M72L rs696217	Dominant	C/C (n=311)	95.41 (0.72)	0.00	0.78	0.99	274 (81.8)	37 (92.5)	1.00	0.063	0.056
		C/A-A/A (n=64)	95.88 (1.24)	0.47 (-2.82-3.75)			61 (18.2)	3 (7.5)	2.75 (0.82-9.20) 3.60 (0.83-15.58)*		
L90G rs4684677	--	A/A (n=355)	96.08 (0.63)	0.00	0.031	0.016	323 (93.6)	33 (84.6)	1.00	0.066	0.079
		A/T (n=28)	90.93 (2.86)	-5.15 (-9.83--0.48) -4.21 (-7.63--0.79)*			22 (6.4)	6 (15.4)	0.37 (0.14-0.99) 0.27 (0.07-1.10)*		
SNPs	Model	TC (mg/dL)		Difference (95% CI)	P-value	P-value adjusted#	LDL-C (mg/dL)		Difference (95% CI)	P-value	P-value adjusted#
		Genotype (N)	Mean (SD)				Genotype (N)	Mean (SD)			
-994CT rs26312	Dominant	C/C (n=309)	218.03 (2.16)	0.00	0.90	0.84	C/C (n=309)	129.94 (1.91)	0.00	0.63	0.90
		C/T- T/T (n=86)	217.48 (4.03)	-0.56 (-9.60-8.49)			C/T- T/T (n=86)	127.94 (3.75)	-1.99 (-10.09-6.10)		
-604GA rs27647	Dominant	A/A (n=120)	210.98 (2.87)	0.00	0.018	0.082	A/A (n=120)	123.47 (2.77)	0.00	0.02	0.049
		G/A- G/G (n=274)	220.77 (2.42)	9.79 (1.71-17.87) 9.17 (-1.10-19.45)#			G/A- G/G (n=274)	132.08 (2.12)	8.60 (1.36-15.84) 9.26 (0.09-18.43)#		
-501AC rs26802	Recessive	A/A-A/C- (n=351)	219.09 (2.06)	0.00	0.061	0.074	A/A-A/C- (n=351)	130.52 (1.84)	0.00	0.1	0.035
		C/C (n=44)	207.75 (4.57)	-11.34 (-23.16-0.49) -14.94 (-31.26-1.38)#			C/C (n=44)	121.66 (4.36)	-8.86 (-19.47- 1.75) -15.71 (-30.26--1.16)#		
R51Q	--	G/G (n=383)	217.36 (1.94)	0.00	0.81	0.60	G/G (n=383)	129.29 (1.74)	0.00	0.52	0.47
		G/A (n=4)	212.75 (7.65)	-4.61 (-41.95-32.72)			G/A (n=4)	118.25 (12.32)	-11.04 (-44.60-22.52)		
M72L rs696217	Dominant	C/C (n=322)	217.57 (2.10)	0.00	0.76	0.82	C/C (n=322)	129.35 (1.88)	0.00	0.74	0.73
		C/A-A/A (n=65)	216.03 (4.88)	-1.54 (-11.64-8.56)			C/A-A/A (n=65)	128.29 (4.44)	-1.06 (-10.15-8.02)		

L90G rs4684677	--	A/A (n=367)	217.60 (1.96)	0.00	0.90	A/A (n=367)	128.91 (1.76)	0.00	0.82
		A/T (n=29)	218.48 (7.26)	0.88 (-13.36 - 15.11)		A/T (n=29)	134.21 (6.33)	5.30 (-7.44-18.04)	0.80

747

748

749

750

* Adjusted for age and BMI. # Adjusted by age, dyslipemic treatment and BMI. BMI: body mass index. N: number; SD: standard deviation.

ORIGINAL 4:

Mora M, Mansego ML, Serra-Prat M, Palomera E, Buquet X, Chaves JF, Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group.

Glucose impairment and ghrelin gene variants are associated to cognitive dysfunction.

Aging Clin Exp Res. 2014 Apr;26(2):161-9.

Glucose impairment and ghrelin gene variants are associated to cognitive dysfunction

M. Mora · M. L. Mansego · M. Serra-Prat ·
E. Palomera · X. Boquet · JF Chaves ·
M. Puig-Domingo · The Mataró Ageing Study Group

Received: 14 February 2013 / Accepted: 10 September 2013 / Published online: 12 March 2014
© Springer International Publishing Switzerland 2014

Abstract

Background and aims Cognitive state and brain volume have been related to body mass index, abdominal fat, waist–hip ratio, components of metabolic syndrome (MS) and ghrelin. Genetic variations within the ghrelin gene have been recently associated to MS. The aim of our study was to investigate cognitive state by Mini-Mental State Examination (MMSE) in relation to MS components (ATP-III criteria) and ghrelin gene polymorphisms in dwelling individuals aged ≥ 70 .

Methods 280 subjects (137 men/143 women, age 77.03 ± 5.92) from the Mataró Ageing Study were included. Individuals were phenotypically characterized by anthropometric variables, lipids, glucose, blood pressure and MMSE. SNPs -501AC (rs26802), -994CT (rs26312), -604GA (rs27647), M72L (rs696217) and L90G (rs4684677) of the ghrelin gene were studied. Genotypes were determined by polymerase chain reaction and SNaP-shot minisequencing.

Results 22.1 % had MMSE < 24 . MMSE < 24 was associated with age ($p < 0.001$), female gender ($p = 0.016$), low education ($p < 0.001$) and glucose impairment or diabetes ($p = 0.040$). MMSE was influenced by obesity, central obesity, MS and glucose impairment. This latter association remained significant after adjustment by gender, age, alcohol, educational level, GDS and ApoE genotype ($p = 0.009$). Ghrelin SNPs were associated to MMSE: M72L C/A genotype showed lower score than C/C ($p = 0.032$, after adjusting for confounders 0.049); L90G A/T genotype showed lower score than A/A ($p = 0.054$, after adjusting 0.005). MMSE < 24 was associated to L90G (39.1 % in A/T genotype vs 19.3 % in A/A, $p = 0.026$, after adjusting for confounders $p = 0.002$, OR 6.18 CI 1.93–21.75).

Conclusions Glucose impairment and L90G Ghrelin gene variant influence cognitive function in old dwelling individuals participating in the Mataró Ageing Study.

Keywords Ghrelin polymorphisms · Cognitive state · Glucose impairment · Metabolic syndrome · MMSE

The Mataró Ageing Study Group: Ayllón J, Buquet X, Bosch A, Burdoy E, Cademas I, Dordas J, Espinosa C, Falcón I, Gordillo M, Merino MJ, Mussoll J, Palomera E, Papiol M, Pous E, Pubill M, Puig J, Puig-Domingo M (Project co-director), Sanahuja J, Serra P, Serra-Prat M (Project co-director), Serrano C, Vilardebò A, Villarroya I.

M. Mora
Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clínic I
Universitari of Barcelona, Barcelona, Spain

M. L. Mansego
Department of Nutrition and Food Sciences, Physiology and
Toxicology, University of Navarra, Pamplona, Navarra, Spain

M. L. Mansego · J. Chaves
Genotyping and Genetic Diagnosis Unit, Research Foundation,
CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas, Hospital
Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain

M. Serra-Prat · E. Palomera
Research Unit and Ciberhep, Hospital de Mataró, Mataró, Spain

X. Boquet
Research Unit Biochemistry Service, Hospital de Mataró,
Mataró, Spain

M. Puig-Domingo (✉)
Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital
Universitari Germans Trias i Pujol, Ctra. del Canyet, s/n,
08916 Barcelona, Spain
e-mail: mpuigd@gmail.com

Introduction

Metabolic syndrome (MS) [1] is associated to severe morbidities, and especially when type-2 diabetes is present, cardiovascular and cerebrovascular diseases [2]. Recent studies have found associations between cognitive impairment and MS [3, 4] and in particular with diabetes [5, 6] and obesity [7]. Moreover, obesity has been linked to reduced brain volume [8] and reduced grey matter volume [9]. However, the relationship between MS and cognitive function is still controversial; some studies have found a positive association [10, 11] while in others no association has been demonstrated [12]. What degree of causality could be attributed to the vascular morbidity or to the metabolic scenario or other factors present in these conditions remains to be established.

Other factors may also play a role in cognitive function, and among these factors different hormones may be relevant. Ghrelin is a candidate participant in this interplay, because it is linked to MS as well as it is recognized as a neuroprotective factor. Ghrelin is an orexigenic hormone secreted mainly by the stomach, which stimulates growth hormone (GH) release, appetite and food intake and plays an important role in regulating the energy homeostasis of the organism [13]. Some studies, including one performed by our group [14], have evaluated the relationship of ghrelin with the MS. In one of those, studying middle-aged individuals [15], lower levels of ghrelin in people with MS was found, and in other in elderly people, this association was mostly explained by body weight [16] and waist circumference [17]. Ghrelin polymorphisms have also been previously explored in the context of its association with MS with variable results [18], some showing no relation with metabolic disturbances [19] while others have found a positive association [20, 21]. In particular, an association has been described between M72L and MS [20, 21] as well as with higher fasting glucose, lower high-density lipoprotein and higher triglyceride levels [20]. In addition, the prevalence of MS has been found to be lower among individuals carrying 51Gln allele [20]. In relation to its functionality, different variants in the promoter region of the ghrelin gene have been associated to increased ghrelin levels (M72L, -604T) [22].

Moreover, ghrelin seems to have an extra-hypothalamic role, promoting learning and memory by activating plasticity in the hippocampus, enhancing reward and motivation and having a neuroprotective role [23]. Several studies have demonstrated that increased levels of ghrelin are associated with better memory retention in rats [24, 25] and protect from development of neurodegeneration in mice after intrahippocampal injection of amyloid A β 1-42 oligomer [26]. Recent studies in Alzheimer disease patients have also shown decreased ghrelin mRNA levels in the

brain, and it has been postulated that this may contribute to the cognitive impairment observed in this disease [27].

The purpose of the present study was to investigate the relationship between cognitive function and MS components (ATP-III criteria) and five SNPs of ghrelin gene that have been previously described to be associated with MS, in non-institutionalized individuals aged 70 years or older.

Subjects and methods

Study population

A cross-sectional study was set up including subjects participating in the Mataró Ageing Study, a population-based cohort study designed to identify risk factors for frailty and successful ageing condition among old people living in Mataró and Argentona (Barcelona, Spain), which have been previously described elsewhere [28]. All non-institutionalized residents aged 70 years or older were eligible for the study. Exclusion criteria included severe physical or mental disability that did not allow visiting the study centre and individuals with previous gastric surgery. Sample selection was done on random basis from the municipal census. A total of 824 individuals of both sexes were invited to participate, this was first done by postal contact, followed by a telephone call from May 2002 to June 2003. Of those invited to participate, 176 (21.3 %) were excluded because of non-fulfilment of selection criteria and 87 (10.6 %) because of impossibility to contact after attempting three times by telephone. Of the remaining 561 individuals, 139 (24.8 %) did not accept to participate, 62 (11 %) accepted but did not come to the appointment visit and 47 (8.4 %) declined to participate for other social reasons. Finally, 313 cases participated in the study (inclusion rate of 55.8 %). As more than 95 % of people older than 65 living in Argentona and Cirera-Molins—a neighbourhood of Mataró city—receive medical assistance in the local medical centres of the Consorci Sanitari del Maresme, individuals initially contacted but who did not participate in the study did not differ in age and sex distribution compared to participants. There were no differences in comorbidities (including cardiovascular, rheumatologic, metabolic and mental disturbances, as well as neoplastic diseases) as evaluated in the clinical records of all individuals under medical coverage of the Consorci Sanitari de Maresme, the only health care provider of this geographical area of the Maresme region of Barcelona.

Data collection and biological samples for genetic studies were obtained in 280 individuals (137 men and 143 women). The Ethic Committee of the Consorci Sanitari de Maresme approved the study protocol and all subjects signed an informed consent before entering.

Data collection

The questionnaires used for evaluating nutrition, the physical assessments and procedures were performed at two Primary Health Care Centres by a trained fieldwork team composed of 10 general practitioners.

According to the study protocol, in the first visit a revision of the electronic medical history of the individual and/or a re-evaluation in case of no previous registration at the Consorci Sanitari of Maresme medical histories database was done. Chronic and previous diseases, life style factors, education, a physical examination and a laboratory study for biochemical, hormonal and genetic determinations were recorded in the database. Educational level was classified as no schooling and schooled individuals. Lifestyle variables such as smoking (never smoking/previous smoker/current smoker) and alcohol (never consuming/occasional/current) were also included.

The physical examination included weight (in kg) and height (in cm) measures with subjects wearing light clothes; waist circumference was measured in standing position in a line between the last rib and the iliac crest. Body mass index (BMI) was calculated as weight divided by height (metres) squared. Blood pressure was measured twice with the subject being seated after 5 min of rest, the mean of two readings was used in the analyses.

Functional capacity was assessed by calculation of Barthel score [29] and considered optimal when score = 100. The Mini-Mental State Examination (MMSE) was used to assess cognitive function and subjects with <24 points were considered cognitively impaired [30]. A validated Spanish version of MMSE was used [31]. MMSE score was evaluated according 5 items dimensions: orientation (in time -5 points- and in place -5 points-), memory fixation (3 points), concentration and calculation (5 points), memory (3 points) and language and building (objects identification: 2 point, talking: 1 point, hand manipulation: 3 points, reading: 1 point, writing: 1 point and copying: 1 point). Depressive status was evaluated performing the Geriatric Depression Scale (GDS) [32].

Analytical measurements

Blood samples for all measurements were obtained after a 12 h of fast through the night. Glucose and lipids were analysed by enzymatic techniques. Total plasma ghrelin concentrations were measured with a human radioimmunoassay (RIA) kit (Linco Research Inc, St. Charles, MO, USA). The detection limit was 93 pg/mL with intra- and inter-assay variation coefficients of 11.1 and 14.7 %, respectively. Total IGF-I was measured using a two-side immunoradiometric assay (Immunotech IGF-I kit, Immunotech-Beckman,

Marseille, France; intra-assay variation coefficients (CV): <6.3 %; interassay CV: 6.8 %; sensitivity: 30 ng/ml).

ApoE measurement

Genotyping for the ApoE polymorphisms was performed following the method described by Hixon and Vernier [33] with minor modifications.

Metabolic syndrome (MS) definition

We used the Adult Treatment Panel III (ATP III) definition of MS [1]. Individuals were classified as having MS if the waist circumference was >102 cm in men or >88 cm in women (central obesity) plus two or more of the following: (1) arterial blood pressure >130/85 mmHg or antihypertensive treatment, (2) triglycerides >150 mg/dl or hypertriglyceridaemia treatment, (3) high-density lipoprotein (HDL) \leq 40 mg/dl in men or \leq 50 mg/dl in women, or (4) fasting glucose \geq 100 mg/dl or diabetes (glucose impairment, GI). Additionally, for data analysis in relation to ghrelin polymorphisms, waist circumference was also used as a continuous variable.

Ghrelin gene polymorphisms

Five single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the ghrelin gene (GHRL) were investigated in this cohort: -994CT (rs26312), -604GA (rs27647), -501AC (rs26802), M72L (rs696217) and L90G (rs4684677). DNA was isolated from peripheral blood cells using the Chemagic System (Chemagen; Baesweiler, Germany). Polymerase chain reaction (PCR) amplicons were designed by Primer3 programme [34] to completely traverse the promoter, exon 1, exon 3 and exon 4 of *GHRL*. The size of PCR products was analysed by electrophoresis on 2 % agarose gels. Products were treated with Exonuclease I (Amersham Biosciences) and shrimp alkaline phosphatase (Amersham Biosciences) to remove excess primers and deoxynucleotide triphosphates. For the examination of the six SNPs, extension SNaPshot primers specific to the polymorphic sites were used for the SNaPshot minisequencing reaction using the ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems). The resulting products were purified by one unit of Calf Intestine Phosphatase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Snapshot products were resuspended in 4.5 μ L Hi-DiTM Formamide (Applied Biosystems) and 0.5 μ L GeneScan Size Standard. Then, they were electrophoretically analysed using a DNA Analyzer 3730 (Applied Biosystems). The results of genotyping were analysed and evaluated by GeneMapper software v. 3.7 (Applied Biosystems).

Table 1 Characteristics of individuals according to MMSE (<24 vs. ≥24)

	Total (<i>n</i> = 280)	MMSE <24 (<i>n</i> = 62)	MMSE ≥24 (<i>n</i> = 218)	<i>p</i>
Age (years)	77.03 (5.92)	80.14 (7.25)	76.17 (5.21)	<0.001
Gender (M/W) (%)	48.9/51.1	35.5/64.5	52.8/47.2	0.016
No schooling (%)	48.9	75.8	41.2	<0.001
Waist circumference (cm)	101.52 (11.56)	101.49 (16.33)	101.53 (9.82)	0.985
Pathologic waist circumference (%)	67.3	80.6	63.4	0.011
Total cholesterol (mg/dl)	201.81 (37.22)	212.77 (44.67)	210.23 (35.05)	0.699
LDL (mg/dl)	129.64 (33.64)	127.01 (44.20)	130.35 (30.25)	0.597
Triglycerides (mg/dl)	126.02 (74.50)	144.64 (115.62)	120.98 (58.05)	0.144
High triglycerides (%)	24.0	23.2	24.2	0.884
HDL (mg/dl)	55.06 (2.61)	54.19 (10.10)	55.29 (13.22)	0.502
Low HDL (%)	19.8	16.1	20.8	0.433
Hypertension (%)	88.1	90.3	87.4	0.537
Fasting glycaemia (mg/dl)	107.23 (27.58)	109.67 (26.50)	105.87 (27.34)	0.355
GI (%)	51.1	63.2	47.8	0.040
BMI (kg/m ²)	28.15 (4.12)	29.33 (3.90)	27.81 (4.13)	0.010
Obesity (IMC ≥30) (%)	30.9	43.5	27.3	0.015
Metabolic syndrome (%)	50	58.9	47.5	0.131
Coronary disease (%)	12.9	11.3	13.4	0.659
Stroke (%)	12.2	9.7	13.0	0.484
Albumin (mg/dl)	41.55 (2.89)	41.39 (3.75)	41.60 (2.62)	0.695
Ghrelin (pg/ml)	1,090.75 (404.85)	1,028.89 (342.73)	1,107.11 (418.95)	0.203
IGF-I (ng/ml)	108.87 (36.84)	101.29 (38.58)	110.90 (36.18)	0.083
Hours of walking/day	1.78 (4.93)	1.52 (2.28)	1.86 (5.46)	0.629
Barthel	96.51 (5.83)	94.34 (9.15)	97.12 (4.32)	0.025
MMSE	28.99 (5.54)	18.58 (3.48)	27.86 (1.66)	<0.001
Possible depression by GDS (%)	34.2	48.3	30.3	0.009
Alcohol (never/occasional/current) (%)	21.9/49.3/28.9	41.7/43.3/15	16.2/51/32.9	<0.001
Smoking (never/previous/current) (%)	57/36.5/6.5	73.8/24.6/1.6	52.3/39.8/7.9	0.008

Values are mean (standard deviation); ns $p > 0.05$; *HDL* high-density lipoprotein, *GI* glucose impairment or diabetes (ATP-III criteria), *BMI* body mass index, *MMSE* Mini-Mental State Examination, *GDS* geriatric depression scale

Data analysis

Categorical variables were expressed as percentages, and continuous data as mean (standard deviation). SNPs association to categorical variables was evaluated by Chi-square or Fisher test accordingly. SNPs association with continuous data was analysed by ANOVA/T Student test for data with a normal distribution and the Kruskal–Wallis/U Mann–Whitney test for data without a normal distribution. Analysis of association with a response variable was based on linear or logistic regression depending on quantitative or categorical variables. A crude analysis was performed, and then adjusted for the variables that were significantly associated to MMSE. The final analysis included those that remained significant. We considered statistical significance for association with a p value <0.05.

Odds ratio was used to evaluate the association of the different pathological conditions considered with each SNP. In the whole cohort, all observed genotypes distributions were compatible with Hardy–Weinberg equilibrium.

Results

Characteristics of the cohort and correlations with phenotype

The phenotypic characteristics of the individuals according to gender have been described elsewhere [14]; roughly, women presented worse metabolic profile, higher prevalence of obesity, central obesity, and metabolic syndrome,

as well as lower levels of total ghrelin and IGF-I. The cohort was studied according to its cognitive state and was divided into two groups: cognitively impaired (MMSE <24, $n = 62$) and not cognitively impaired (MMSE ≥ 24 , $n = 218$). The general characteristics of the cohort and its description according to cognitive deterioration are shown in Table 1. No association was found between MMSE or cognitive impairment and physical activity (hours of walking/day) or medication.

MMSE score was inversely correlated to BMI ($p = 0.031$, $r = -0.129$), waist circumference ($p < 0.001$, $r = -0.555$) and triglyceridaemia ($p = 0.040$, $r = -0.127$), but not to cholesterol levels, nor to waist–hip ratio and nor to ghrelin and IGF-I levels. However, after adjustment by gender, age and educational level became non significant. MMSE was significantly associated to alcohol and smoking (MMSE values for never alcohol/occasional/current: $25.53 \pm 5.43/26.02 \pm 4.02/27.13 \pm 3.77$, $p < 0.001$, after adjustment for age and gender $p = 0.003$; MMSE values for no smoking/previous/current: $25.03 \pm 4.88/26.64 \pm 3.73/27.94 \pm 2.44$, $p = 0.002$, after adjustment for age and gender $p = 0.234$). When association between MMSE score and metabolic parameters was analysed, the only association that remained significant after adjustment by gender, age and educational level was GI (MMSE 25.74 (4.75) in individuals with GI vs 26.74 (3.79) in individuals without GI, $p = 0.003$, after adjustment $p = 0.023$; Table 2). No association was found between MMSE and medical treatment such as antihypertensive, antidiabetic, antiplatelet, anticoagulant or anxiolytic agents.

Ghrelin polymorphisms in relation to mental state

Analysis of ghrelin plasma levels as a function of ghrelin polymorphisms was searched for and no association was observed. We found an association between MMSE score as a continuous variable with M72L and L90G SNPs (Table 3). M72L C/A genotype was associated to a lower MMSE in comparison to C/C genotype (C/A 24.53 (5.00) and C/C 26.18 (4.15), $p = 0.032$). L90G A/T genotype was associated to a lower MMSE in comparison to A/A (A/T 24.30 (5.31) and A/A 26.12 (4.18), $p = 0.054$). In both, the association remained significant after adjustments by age, gender, educational level, GI and ApoE ($p = 0.049$ for M72L and $p = 0.005$ for L90G).

When we studied the relationship between ghrelin polymorphisms and cognitive impairment (Table 4) we found an association with L90G (39.1 % of MMSE score <24 in A/T in comparison with 19.3 % in A/A, $p = 0.026$). When this association was adjusted by age, gender, alcohol, GDS, GI, educational level and ApoE, it remained significant ($p = 0.002$; OR 6.18 CI 1.93–21.75), $R^2 = 0.250$).

Table 2 Relationship between MMSE and metabolic parameters, as crude data and after adjusting by age, gender, alcohol and educational level

	MMSE mean (SD)	p	p^a
Obesity			
Yes	24.23 (4.18) 25.32 (4.67) ^a	0.022	0.512
No	26.83 (4.90) 26.25 (4.17) ^a		
Central obesity			
Yes	25.24 (4.70) 25.43 (4.51) ^a	0.001	0.287
No	26.96 (3.66) 27.08 (3.73) ^a		
Metabolic Syndrome			
Yes	25.35 (4.52) 25.35 (4.54) ^a	0.024	0.263
No	26.57 (4.52) 26.56 (4.16) ^a		
GI			
Yes	25.74 (4.75) 25.19 (4.78) ^a	0.003	0.023
No	26.74 (3.79) 26.70 (3.81) ^a		
Diabetes			
Yes	24.76 (5.10) 24.94 (5.05) ^a	0.087	0.342
No	26.05 (4.25) 26.23 (4.11) ^a		

Values are mean (standard deviation); ns $p > 0.05$; Obesity: BMI ≥ 30 kg/m²; BMI body mass index, GI glucose impairment (ATP-III criteria)

^a Adjusted by age, gender, alcohol, GDS, educational level and ApoE

Discussion

We studied the relationship between MS components, ghrelin polymorphisms and cognitive state in a sample of dwelling old individuals with a well-characterized metabolic phenotype and belonging to a Mediterranean population. We found a positive association of MMSE score with glucose status, M72L and L90G polymorphisms of the ghrelin gene; all the analyses performed were adjusted for gender and phenotype, as well as ApoE genotype, indicating that these ghrelin SNPs do have an independent association with cognitive status in our sample of population of the Mataró Ageing study.

Certain metabolic phenotypes, in particular obesity, and especially glucose impairment, have been linked to cognitive state. Several reports have recently been published in relation to this subject, reinforcing the potential deleterious

Table 3 Association between MMSE and ghrelin polymorphisms

SNP	MMSE mean (SD)	Unadjusted	Adjusted ^a	Adjusted ^b
-994CT	C/C (<i>n</i> = 213) 26.06 (4.31)	<i>p</i> = 0.612	-	-
	C/T (<i>n</i> = 51) 25.47 (4.37)			
-604GA	A/A (<i>n</i> = 84) 26.02 (4.50)	<i>p</i> = 0.768	-	-
	G/A (<i>n</i> = 135) 25.79 (4.25)			
	G/G (<i>n</i> = 46) 26.30 (4.31)			
-501AC	A/A (<i>n</i> = 127) 26.06 (4.18)	<i>p</i> = 0.748	-	-
	C/A (<i>n</i> = 105) 25.72 (4.54)			
	C/C (<i>n</i> = 33) 26.30 (4.31)			
M72L	C/A (<i>n</i> = 36) 24.53 (5.00)	<i>p</i> = 0.032	<i>p</i> = 0.058	<i>p</i> = 0.049
	C/C (<i>n</i> = 230) 26.18 (4.15)			
L90G	A/A (<i>n</i> = 243) 26.12 (4.18)	<i>p</i> = 0.054	<i>p</i> = 0.005	<i>p</i> = 0.005
	A/T (<i>n</i> = 23) 24.30 (5.31)			

MMSE Mini-Mental State Examination

^a By age, gender, educational level, alcohol, GDS and GI (glucose impairment or diabetes in ATP-III criteria)

^b By age, gender, educational level, alcohol, GDS, GI and ApoE

role of metabolic syndrome in cognitive impairment. In relation to glucose state, a systematic review of prospective observational studies [5] supports that diabetic people have a greater rate of cognitive decline. Hippocampus and pre-frontal lobe seem to have a reduced volume in diabetic individuals [35], which could cause specific verbal memory impairments. This hippocampal volume loss in diabetics may be due to hyperglycaemia and the formation of toxic advanced glycation end-products; also, the presence of increased pro-inflammatory cytokines such as IL-6 in obesity, and its coexisting endothelial dysfunction condition may contribute to decreased substrate supply to the hippocampus, neuronal loss and finally to cognitive deterioration. In our cohort the crude analysis, as well as the adjustment, showed a strong deleterious effect of GI upon MMSE score. When diabetic subjects were analysed alone, a trend was also observed; as diabetic individuals were older than the whole group of subjects with fasting glucose >100 mg/dl, the important effect of age, as well as the higher statistical power of the former group of GI may explain these differences.

Table 4 Association between cognitive impairment and ghrelin polymorphisms

SNP	MMSE <24 (%)	Unadjusted	Adjusted	OR (CI 95 %)
-994CT	C/C 21.1	<i>p</i> = 0.872	-	-
	C/T 21.6			
-604GA	A/A 16.7	<i>p</i> = 0.375	-	-
	G/A 24.4			
	G/G 19.6			
-501AC	A/A 21.3	<i>p</i> = 0.357	-	-
	C/A 23.8			
	C/C 12.1			
M72L	C/A 30.6	<i>p</i> = 0.133	-	-
	C/C 19.6			
L90G	A/A 19.3	<i>p</i> = 0.026	<i>p</i> = 0.002*	6.18 (1.93–21.75)*
	A/T 39.1			

* By age, gender, GDS, alcohol and educational level, GI (glucose impairment or diabetes in ATP-III criteria) and ApoE. R2 model: 0.250

Other components of metabolic syndrome, such as insulin resistance per se, as well as metabolic syndrome as a whole have been postulated as factors or conditions related to cognitive impairment [3, 4, 6]. The association between BMI and dementia is a controversial issue; a study has shown that BMI is associated to a decreased brain volume but with no effect in cognition [36] while another showed that higher BMI is associated to reduced risk of dementia [37]. A more consistent relationship has been described for central obesity and dementia instead of global obesity [38]. In individuals less than 75 years, BMI and adiposity show a U-shaped relationship with dementia risk, by which very low and very high BMI quartiles showed a worse cognitive function; this relationship is difficult to interpret in cross-over studies as most or a very significant proportion of patients with dementia usually lose weight after diagnosis [39]. This dual association of either a protective or a deleterious effect of body weight on cognition in relation to a younger or not so younger age may indicate that an individual predisposition may modulate such a relationship. In those individuals prone to develop cognitive impairment, obesity may act as an accelerator while in those resistant or lacking this susceptibility and having survive obesity after 70 years, such a condition may be no more deleterious but protective.

An indirect effect of ghrelin/obestatin generated in the digestive tract upon metabolic syndrome development and its consequences on cognitive function may also be possible.

Ghrelin has been previously related to different conditions found in elderly people [14, 16, 17, 40, 41]. In a previous study, we found hunger and weight loss to be

influenced by ghrelin levels [41]. A recent study discusses the role for ghrelin in cognitive function in the non-demented population; in one small study including 35 individuals [42] circulating acetylated ghrelin was higher in subjects with lower MMSE. In our subjects, total ghrelin levels did not differ between any particular cognitive state; this may be related to the potentially insufficient value of a single fasting determination of ghrelin, a hormone which fluctuates during the daytime period in relation to prandial physiology, as well as the measurement of total ghrelin rather than the acetylated form. In Alzheimer disease patients, an altered expression of the ghrelin gene has been recently reported, by which a lower expression of the gene in the temporal lobe participates in the development of cognitive deficiency [27]. The data coming from animal models show that intrahippocampal ghrelin administration in mice is followed by an amelioration of cognitive dysfunction produced by beta amyloid injection [26]. The interpretation of all these findings is currently difficult due to the relatively low number of studies that have been performed, although a relationship between ghrelin seems plausible. More data from both clinical and experimental studies are required for its clarification. Whether peripheral ghrelin acts in the central nervous system or just ghrelin synthesized in the brain participates in the modulation of different central functions will require extensive studies. Also, the ghrelin gene product obestatin described in 2005 [43], which is thought to act as a contra-ghrelin factor, may modulate ghrelin gene actions on cognition, but until now data regarding in this issue are scarce. Obestatin action has been implicated in the protection and improvement of cognitive function in rats, as ghrelin does. However, they appear to work in parallel with the metabolic effect. Moreover, L90G polymorphism is related to obestatin expression, and thus, part of L90G Ghrelin genotype effect may be due to obestatin [22, 43]. A recent study in Japanese population has described an association between L90G and Alzheimer's disease [44]. To our knowledge, this is the first time that an association between ghrelin polymorphisms and MMSE is reported, and specifically in relation to M72L and L90G.

The strengths of our study are that the sample is a homogeneous sample obtained from specific geographical with a cultural common background that warrants a similar lifestyle; moreover, the phenotypical characterization of the subjects is quite extensive. However, our study has also several limitations. First, although it is a population-based study where non-institutionalized individuals were selected, the inclusion of a younger sample of individuals would have overcome the problem of the overrepresentation of certain genotypes due to survival bias. The number of included subjects was also restricted to the recruitment possibilities in the specific geographical areas involved in

the study; a superior number of participants would have allowed a stronger statistical power. Additionally, the measurement of acylated ghrelin rather than total ghrelin, as well as obestatin, would have helped to explore potential relationships not found with our current design. In our subject's sample, a high prevalence of metabolic syndrome and a high percentage of central obesity according to ATP-III criteria were found, which may have contributed to a bias. Moreover, we have to take into account that MMSE is considered a screening test of cognitive function with great value, although a deeper insight to the characterization of the cognitive function status requires the use of neuropsychological test batteries.

Conclusions

In summary, metabolic factors contribute to different cognitive status assessed by MMSE score; glucose impairment seems to be one of these factors among others such as obesity, in particular central obesity, and metabolic syndrome. M72L Ghrelin polymorphism seems to influence MMSE and L90G A/T is associated to cognitive impairment in elder Spanish community dwelling individuals.

Acknowledgments This work was supported by Fondo Investigaciones Sanitarias Grant 07/0601. CIBERDEM is an initiative of Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) research grant PI070497 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias; ACOMP/2009/201, GRUPOS03/101, 2005/027 and PROMETEO/2009/029 from the Valencian Government. Special thanks to Nicola Van Berckel for her English version of the manuscript. The authors have nothing to declare in relation to this article.

Conflict of interest The authors have nothing to declare in relation to this article.

References

1. Anonymous (2001) Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *JAMA* 285:2486–2497
2. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT (2002) The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288:2709–2716
3. Akbaraly TN, Kivimaki M, Shipley MJ, Tabak AG, Jokela M, Virtanen M, Marmot MG, Ferrie JE, Singh-Manoux A (2010) Metabolic syndrome over 10 years and cognitive functioning in late midlife: the Whitehall II study. *Diabetes Care* 33:84–89
4. Raffaitin C, Gin H, Empana JP, Helmer C, Berr C, Tzourio C, Portet F, Dartigues JF, Alperovitch A, Barberger-Gateau P (2009) Metabolic syndrome and risk for incident Alzheimer's disease or vascular dementia: the Three-City Study. *Diabetes Care* 32:169–174

5. Cukierman T, Gerstein HC, Williamson JD (2005) Cognitive decline and dementia in diabetes—systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia* 48:2460–2469
6. Yaffe K, Weston AL, Blackwell T, Krueger KA (2009) The metabolic syndrome and development of cognitive impairment among older women. *Arch Neurol* 66:324–328
7. Whitmer RA, Gunderson EP, Barrett-Connor E, Quesenberry CP Jr, Yaffe K (2005) Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *BMJ* 330:1360
8. Raji CA, Ho AJ, Parikhshak NN, Becker JT, Lopez OL, Kuller LH, Hua X, Leow AD, Toga AW, Thompson PM (2010) Brain structure and obesity. *Hum Brain Mapp* 31:353–364
9. Soreca I, Rosano C, Jennings JR, Sheu LK, Kuller LH, Matthews KA, Aizenstein HJ, Gianaros PJ (2009) Gain in adiposity across 15 years is associated with reduced gray matter volume in healthy women. *Psychosom Med* 71:485–490
10. Laudisio A, Marzetti E, Pagano F, Cocchi A, Franceschi C, Bernabei R, Zuccala G (2008) Association of metabolic syndrome with cognitive function: the role of sex and age. *Clin Nutr* 27:747–754
11. van den Berg E, Biessels GJ, de Craen AJ, Gussekloo J, Westendorp RG (2007) The metabolic syndrome is associated with decelerated cognitive decline in the oldest old. *Neurology* 69:979–985
12. Muller M, Tang MX, Schupf N, Manly JJ, Mayeux R, Luchsinger JA (2007) Metabolic syndrome and dementia risk in a multiethnic elderly cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord* 24:185–192
13. van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E (2004) Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25:426–457
14. Serra-Prat M, Alfaro SR, Palomera E, Casamitjana R, Buquet X, Fernandez-Fernandez C, Puig-Domingo M (2009) Relationship between ghrelin and the metabolic syndrome in the elderly: a longitudinal population-based study. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 70:227–232
15. Ukkola O, Poikko SM, Antero KY (2006) Low plasma ghrelin concentration is an indicator of the metabolic syndrome. *Ann Med* 38:274–279
16. Langenberg C, Bergstrom J, Laughlin GA, Barrett-Connor E (2005) Ghrelin and the metabolic syndrome in older adults. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6448–6453
17. Vartiainen J, Kesaniemi YA, Ukkola O (2006) Sequencing analysis of ghrelin gene 5' flanking region: relations between the sequence variants, fasting plasma total ghrelin concentrations, and body mass index. *Metabolism* 55:1420–1425
18. Pulkkinen L, Ukkola O, Kolehmainen M, Uusitupa M (2010) Ghrelin in diabetes and metabolic syndrome. *Int J Pept* 2010, Art ID 248948. doi:10.1155/2010/248948
19. Bing C, Ambye L, Fenger M, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, Urhammer SA (2005) Large-scale studies of the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene in relation to the metabolic syndrome and associated quantitative traits. *Diabet Med* 22:1157–1160
20. Steinle NI, Pollin TI, O'Connell JR, Mitchell BD, Shuldiner AR (2005) Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6672–6677
21. Xu LL, Xiang HD, Qiu CC, Xu Q (2008) Association of ghrelin polymorphisms with metabolic syndrome in Han Nationality Chinese. *Biomed Environ Sci* 21:188–192
22. Zavarella S, Petrone A, Zampetti S, Gueorguiev M, Spoletini M, Mein CA, Leto G, Korbonits M, Buzzetti R (2008) A new variation in the promoter region, the -604 C > T, and the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene are associated with protection to insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 32:663–668
23. Andrews ZB (2011) The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *Trends Neurosci* 34:31–40
24. Carlini VP, Monzon ME, Varas MM, Cragnolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR (2002) Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 299:739–743
25. Carlini VP, Varas MM, Cragnolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR (2004) Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem Biophys Res Commun* 313:635–641
26. Moon M, Choi JG, Nam DW, Hong HS, Choi YJ, Oh MS, Mook-Jung I (2011) Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid-beta1-42 oligomer-injected mice. *J Alzheimers Dis* 23:147–159
27. Gahete MD, Rubio A, Cordoba-Chacon J, Gracia-Navarro F, Kineman RD, Avila J, Luque RM, Castano JP (2010) Expression of the ghrelin and neurotensin systems is altered in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 22:819–828
28. Puig-Domingo M, Serra-Prat M, Merino MJ, Pubill M, Burdoy E, Papiol M (2008) Muscle strength in the Mataro aging study participants and its relationship to successful aging. *Aging Clin Exp Res* 20:439–446
29. Mahoney FI, Barthel DW (1965) Functional evaluation: the barthel index. *Md State Med J* 14:61–65
30. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state" A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189–198
31. Blesa R, Pujol M, Aguilar M, Santacruz P, Bertran-Serra I, Hernandez G, Sol JM, Pena-Casanova J (2001) Clinical validity of the 'mini-mental state' for Spanish speaking communities. *Neuropsychologia* 39:1150–1157
32. Hoyl MT, Alessi CA, Harker JO, Josephson KR, Pietruszka FM, Koelfgen M, Mervis JR, Fitten LJ, Rubenstein LZ (1999) Development and testing of a five-item version of the Geriatric Depression Scale. *J Am Geriatr Soc* 47:873–878
33. Hixson JE, Vernier DT (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 31:545–548
34. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365–386
35. Bruehl H, Wolf OT, Sweat V, Tirsi A, Richardson S, Convit A (2009) Modifiers of cognitive function and brain structure in middle-aged and elderly individuals with type 2 diabetes mellitus. *Brain Res* 1280:186–194
36. Ward MA, Carlsson CM, Trivedi MA, Sager MA, Johnson SC (2005) The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. *BMC Neurol* 5:23
37. Hughes TF, Borenstein AR, Schofield E, Wu Y, Larson EB (2009) Association between late-life body mass index and dementia: the Kame Project. *Neurology* 72:1741–1746
38. West NA, Haan MN (2009) Body adiposity in late life and risk of dementia or cognitive impairment in a longitudinal community-based study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64:103–109
39. Luchsinger JA, Patel B, Tang MX, Schupf N, Mayeux R (2007) Measures of adiposity and dementia risk in elderly persons. *Arch Neurol* 64:392–398
40. Serra-Prat M, Fernandez X, Burdoy E, Mussoll J, Casamitjana R, Puig-Domingo M (2007) The role of ghrelin in the energy homeostasis of elderly people: a population-based study. *J Endocrinol Invest* 30:484–490
41. Serra-Prat M, Palomera E, Roca M, Puig-Domingo M (2010) Long-term effect of ghrelin on nutritional status and functional capacity in the elderly: a population-based cohort study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 73:41–47

42. Spitznagel MB, Benitez A, Updegraff J, Potter V, Alexander T, Glickman E, Gunstad J (2010) Serum ghrelin is inversely associated with cognitive function in a sample of non-demented elderly. *Psychiatry Clin Neurosci* 64:608–611
43. Zhang JV, Ren PG, vsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310:996–999
44. Shibata N, Ohnuma T, Kuerban B, Komatsu M, Arai H (2011) Genetic association between ghrelin polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *Dement Geriatr Cogn Disord* 32:178–181

ORIGINAL 5:

Mora M, Granada ML, Roca M, Palomera E, Puig R, Serra-Prat M, Puig-Domingo M.

Obestatin does not modify weight and nutritional behavior but is associated with metabolic syndrome in old women.

Clin Endocrinol (Oxf). 2013 Jun;78(6):882-90.

ORIGINAL ARTICLE

Obestatin does not modify weight and nutritional behaviour but is associated with metabolic syndrome in old women

Mireia Mora*, Maria L. Granada†, Maria Roca†, Elisabet Palomera‡, Rocio Puig§, Mateu Serra-Prat‡ and Manel Puig-Domingo§

*Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clínic i Universitari of Barcelona, Barcelona, †Department of Biochemistry, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, ‡Research Unit and Ciberhep, Hospital de Mataró, Mataró and §Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

Summary

Objective Ghrelin and obestatin have apparent opposite orexi-genic and anorexigenic effects, although the latter has not been firmly demonstrated in humans. So far, little data have been reported in relation to its potential association with metabolic syndrome (MS). The objective was to study obestatin concentrations in relation to nutritional parameters and eating behaviours in old women.

Design, Patients and Measurements Prospective study; a total of 110 women (age: 76.93 ± 6.32) from the Mataró Ageing Study were included. Individuals were characterized by anthropometric variables, lipids, glucose, blood pressure, MS components (Adult Treatment Panel III criteria), anorexia and nutritional status by Mini Nutritional Assessment Short Form (MNA-SF) and re-evaluated at 2-year follow-up. Obestatin was measured by IRMA.

Results 58.2% of the subjects had MS; at 2-year follow-up 24.1% had a weight loss >5%, 7.2% >10%, and 26.4% changed their MNA-SF score to risk of malnutrition category. Anorexia was present in 38.4%. Obestatin levels were not related to either change of weight, MNA-SF or anorexia, but a positive correlation was found with the absolute difference between basal and 2-year waist circumference (WC) ($r = 0.429$; $P < 0.001$) and relative difference between basal and 2-year WC ($r = 0.420$; $P < 0.001$); both remained significant after adjusting for age and body mass index. When obestatin was divided into quartiles, a significant lineal trend was observed in relation to WC ($P = 0.049$), absolute and relative difference between basal and

2-year WC (both $P < 0.001$). Obestatin was associated with glucose impairment (69.0% in 4th quartile vs 47.5% in 1st to 3rd, $P = 0.047$; after adjustment, $P = 0.098$) and MS (77.8% in 4th vs 51.3% in 1st to 3rd, $P = 0.017$; after adjustment, $P = 0.046$, OR 2.90 (1.02–8.25) 4th vs 1st to 3rd).

Conclusions Obestatin is elevated in aged women bearing MS but is otherwise not associated with other nutritional parameters, weight loss or anorexia.

(Received 26 March 2012; returned for revision 15 May 2012; finally revised 26 June 2012; accepted 1 July 2012)

Introduction

Ghrelin¹ and obestatin² are two gastrointestinal hormones generated by the post-translational processing of their common precursor, preproghrelin,³ a product of the ghrelin gene. Both hormones participate in the regulation of energetic homeostasis, food intake, body composition and adiposity, but with apparent opposite effects.^{4,5} Ghrelin is mostly an orexi-genic hormone which enhances appetite and increases food intake in humans.⁶ It also stimulates gastrointestinal motility and gastric emptying. On the other hand, obestatin has been described to have opposite effects in comparison with ghrelin on appetite, reducing food intake and gastric emptying, inhibiting jejunal contraction and preventing from body weight gain.² However, the role of obestatin has not been firmly confirmed in humans, and some of its effects have not been universally reproduced.⁷

Recent studies have observed differences in obestatin and ghrelin levels in relation to obesity and anorexia nerviosa: one study described higher obestatin levels in obese women in relation to normal weight women, with lower ghrelin levels and ghrelin/obestatin ratio⁸ and another observed lower levels of obestatin and ghrelin in obese individuals.⁹ On the other hand, obestatin is higher in anorexic subjects and lower in obese individuals¹⁰ and higher in anorexic but no different in bulimic individuals.¹¹ Although results are not unanimous, ghrelin gene products have been proposed to be implicated in a complementary manner in energetic homeostasis and body

Correspondence: Manel Puig-Domingo, Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Germans Trias i Pujol, Ctra. del Canyet, s/n, 08916 Barcelona, Spain. Tel.: 00 34 934 651 200; Fax: 00 34 934 978 497; E-mail: mpuigd@gmail.com

The Mataró Ageing Study Group: Ayllón J, Buquet X, Bosch A, Burdoy E, Cademas I, Dordas J, Espinosa C, Falcón I, Gordillo M, Merino MJ, Mussoll J, Palomera E, Papiol M, Pous E, Pubill M, Puig J, Puig-Domingo M (Project co-director), Sanahuja J, Serra P, Serra-Prat M (Project co-director), Serrano C, Vilardebò A, Villarroya I.

weight control. In relation to hunger, controversial results have been reported for obestatin as it may not modify food intake *per se*, and its role is probably related to an indirect negative effect on the orexigenic role of ghrelin. Furthermore, it cannot be excluded that its anorexigenic effect relies mostly on peripheral sites of action.¹²

Several groups including ours have investigated the role of ghrelin in the elderly in relation to metabolic syndrome (MS), hunger and satiety.^{13–16} However, no information has been reported in relation to obestatin and its potential association with MS and anorexia in old people.

The purpose of the present study was to investigate obestatin concentrations in relation to nutritional parameters, eating behaviour and MS in old women.

Subjects and methods

Study population

All subjects of the present study were participating in the Mataró Ageing Study, a population-based prospective cohort study designed to identify risk factors for frailty and successful ageing condition among old people. The study group was selected from the inhabitants of Mataró and Argentona (Barcelona, Spain), as previously described elsewhere.¹⁷ Briefly, all noninstitutionalized residents aged 70 years or older were eligible for the study. Exclusion criteria included severe physical or mental disabilities that did not allow visiting the study centre and individuals with previous gastric surgery. Samples were selected on random basis from the municipal census. A total of 824 individuals of both sexes were invited to participate. This was first done by postal contact, followed by a telephone call from May 2002 to June 2003. Of those invited to participate, 176 (21.3%) were excluded because of nonfulfilment of selection criteria and 87 (10.6%) because of the inability to contact after attempting three times by telephone. Of the remaining 561 individuals, 139 (24.8%) did not accept to participate, 62 (11%) accepted but did not come to the visit and 47 (8.4%) declined to participate for other social reasons. Finally, 313 cases participated in the study (inclusion rate of 55.8%). As more than 95% of people older than 65 living in Argentona and Cirera-Molins are visited in local medical centres, individuals initially contacted but who did not participate in the study did not differ in age and sex distribution compared with participants. Neither were there differences in comorbidities (including cardiovascular, rheumatologic, metabolic and mental disturbances, as well as neoplastic diseases) as evaluated in the clinical records of the Consorci Sanitari of Maresme.

A total of 110 women from the Mataró Ageing Study were finally included, in which all data collection and biological samples for obestatin were available. The ethics committee of the Consorci Sanitari of Maresme approved the study protocol, and all subjects signed an informed consent before entering. A further re-evaluation was performed at 2-year follow-up.

Data collection

The questionnaires used for evaluating nutrition, the physical assessments and other procedures were performed at two primary healthcare centres by a trained fieldwork team composed of 10 general practitioners.

According to the study protocol, in the first visit, a revision of the electronic medical history of the individual and/or a re-evaluation in the case of no previous registration at the Consorci Sanitari of Maresme medical histories database was performed. Chronic and previous diseases, lifestyle factors, education, a physical examination and a laboratory study for biochemical and hormonal determinations were recorded in the database.

The physical examination included weight (in kg) and height (in cm) measurements with subjects wearing light clothes; waist circumference (WC) was measured in standing position in a line between the last rib and the iliac crest. Hip and WCs were used to calculate the waist–hip ratio. Body mass index (BMI) was calculated as weight divided by height (metres) squared. We calculated absolute difference in weight, BMI and WC using the initial and the 2-year values and the relative difference by dividing the absolute difference by the initial value. Triceps perimeter and triceps skinfold were also evaluated. Blood pressure was measured twice with the subject being seated after 5-min rest, and the mean of two readings was used in the analyses. Anorexia was assessed by a questionnaire, and all participants were also given the short version of the Mini Nutritional Assessment Short Form (MNA-SF) to assess nutritional risk.¹⁸ This questionnaire classifies subjects into two categories: well nourished (if >10 points) and at risk of malnutrition (if ≤ 10 points). Functional capacity was evaluated by calculation of Barthel score¹⁹ and considered optimal when score = 100. The Mini Mental State Examination (MMSE) was used to assess cognitive function, and subjects with ≥ 24 points were considered not deteriorated.²⁰ Depressive status was evaluated by performing the Geriatric Depression Scale.²¹

Hormonal measurements

Blood samples for all measurements were obtained after a 12-h fast through the night. Glucose and lipids were analysed by enzymatic techniques. Serum was obtained after centrifugation and stored in aliquots at –70 °C until assayed. Total plasma ghrelin concentrations were measured with a human radioimmunoassay (RIA) kit (Linco Research Inc, St Charles, MO, USA). The detection limit was 93 pg/ml with intra- and interassay variation coefficients of 11.1% and 14.7%, respectively. Total IGF-I was measured using a two-side immunoradiometric assay (Immunotech IGF-I kit; Immunotech-Beckman, Marseille, France; intraassay variation coefficients (CV): <6.3%, interassay CV: 6.8%, sensitivity: 30 ng/ml). Serum obestatin was measured by a commercially available enzyme immunoassay (Human Obestatin EIA; Yanaihara Institute, Fujinomiya-SHI, Shizuoka, Japan). The intra- and interassay coefficients of variation were 2.62% and 7.3%, respectively. The detection limit of the assay was 0.231 ng/ml. Obestatin was categorized into quartiles (1st quartile, <1.49 ng/ml; 2nd quartile, 1.49–1.91 ng/ml; 3rd

Table 1. Characteristics of the individuals according to BMI

	Total (n = 110)	BMI < 30 (n = 62)	BMI ≥ 30 (n = 48)	P
Age (years; mean ± SD)	76.93 ± 6.32	77.86 ± 7.21	75.60 ± 4.50	0.200
Barthel (mean ± SD)	95.90 ± 5.22	96.69 ± 5.04	94.76 ± 5.40	0.013
MEC (mean ± SD)	28.39 ± 6.05	28.11 ± 6.04	28.71 ± 6.18	0.418
Weight (mean ± SD)	67.28 ± 12.03	60.70 ± 8.90	76.34 ± 9.69	<0.001
WC (mean ± SD)	102.18 ± 10.76	98.03 ± 10.08	107.90 ± 8.96	<0.001
BMI (mean ± SD)	29.01 ± 4.36	26.20 ± 3.02	32.88 ± 2.61	<0.001
MNA (mean ± SD)	13.40 ± 2.01	13.41 ± 1.93	13.38 ± 2.13	0.997
Central obesity by ATP-III (%)	91.59	87.10	97.78	0.034
Fasting glucose (mg/dl)	105.56 ± 25.83	101.33 ± 22.83	109.17 ± 27.19	0.114
Glucose impairment by ATP-III (%)	53.20	46.80	59.10	0.211
MS by ATP-III (%)	58.25	50.82	60.05	0.063
Loss weight >5% (%)	24.10	20.00	30.30	0.283
Loss weight >10% (%)	7.23	2.00	15.15	0.024
Worsening in MNA-SF (%)	26.36	25.80	28.89	0.723
Anorexia (%)	34.88	34.00	34.29	0.148
Ghrelin (pg/ml; mean ± SD)	1041.55 ± 399.62	1048.02 ± 415.01	1044.32 ± 391.71	0.963
Obestatin (ng/ml; mean ± SD)	1.93 ± 0.57	1.87 ± 0.59	2.03 ± 0.51	0.159
Ghrelin/obestatin (mean ± SD)	580.34 ± 274.68	607.73 ± 295.70	544.35 ± 248.93	0.209
Basal insulin (mUI/l)	11.08 ± 7.50	10.13 ± 7.87	12.65 ± 6.97	0.088
HOMA-IR	3.03 ± 2.59	2.77 ± 3.01	3.44 ± 1.93	0.201
Estradiol (pg/ml)	33.31 ± 11.22	32.29 ± 11.26	34.27 ± 10.54	0.359

ATP-III, Adult Treatment Panel III; HOMA-IR, homoeostasis model assessment of insulin resistance; WC, waist circumference; BMI, body mass index; MNA-SF, Mini Nutritional Assessment; MS, metabolic syndrome. Bold values denotes statistical significance.

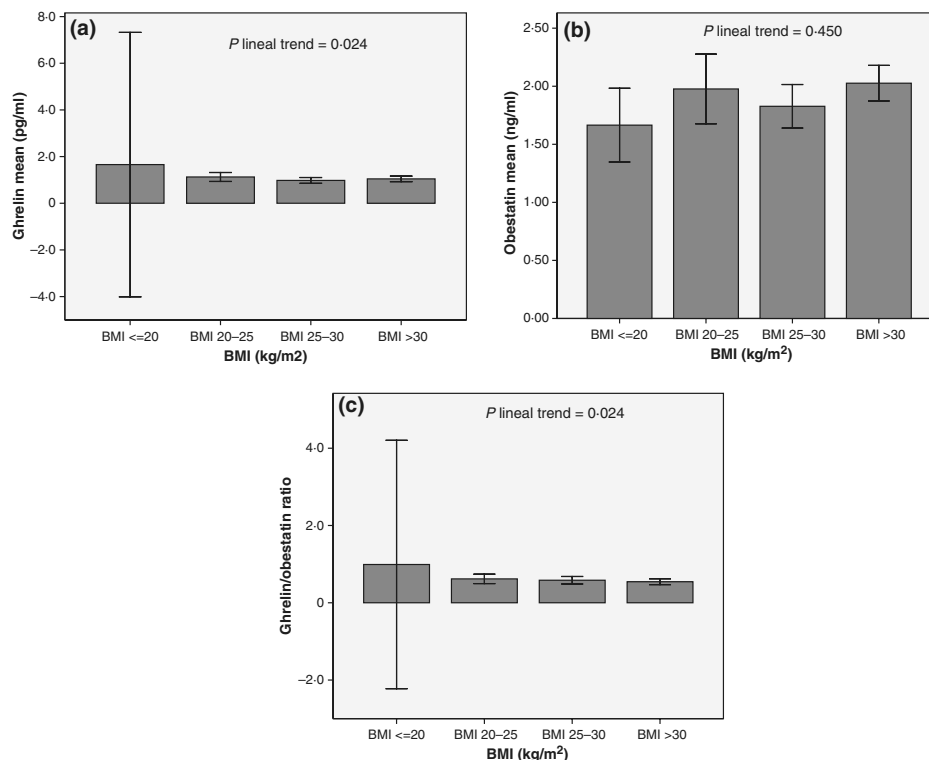


Fig. 1 Association between body mass index and ghrelin levels (Fig. 1a), obestatin levels (Fig. 1b) and ghrelin/obestatin ratio (Fig. 1c).

quartile, 1.91–2.98 ng/ml and 4th quartile, ≥2.98 ng/ml). Immunoreactive insulin levels were determined using an automated electrochemiluminescence immunoassay (Modular E,

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The analytical sensitivity was 0.2 mUI/l. The interassay coefficient of variation was <2.8%. Insulin resistance was determined using homoeosta-

sis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and calculated using fasting glucose and insulin using the following formula: HOMA-IR-index = fasting insulin (mUI/l) \times fasting glucose (mm)/22.5.

Metabolic syndrome definition

We used the Adult Treatment Panel III (ATP III) definition of MS.²² Individuals were classified as having MS if the WC was >88 cm (central obesity) plus two or more of the following: (i) arterial blood pressure >130/85 mmHg or antihypertensive treatment, (ii) triglycerides >150 mg/dl or hypertriglyceridaemia treatment, (iii) high-density lipoprotein (HDL) \leq 50 mg/dl or (iv) fasting glucose \geq 100 mg/dl or diabetes (glucose impairment, GI).

Data analysis

Categorical variables were expressed as percentages, and continuous data as mean (standard deviation). Kolmogorov–Smirnov test was used to assess normality of continuous variables. To compare means Student's *t*-test, Mann–Whitney *U*-test or ANOVA were used as suitable. Association of continuous variables was evaluated using Pearson or Spearman correlations; multiple regressions were used to adjust the variables when correlation was significant. Categorical variables were studied using Chi-square test. We considered statistical significance for association with a *P*-value < 0.05 and as a trend for significance with a *P*-value \leq 0.1. Odds ratio was used to evaluate the association of the different pathological conditions considered with obestatin and ghrelin/obestatin ratio.

Results

The phenotypic characteristics of the individuals according to BMI are described in Table 1. Of the 110 women, 62 had normal weight or were overweight and 48 were obese. 58.2% of the subjects had MS; at 2-year follow-up 24.1% had a weight loss >5% and 7.2% >10% and 26.4% changed their MNA-SF score to one, indicating risk of malnutrition category. Anorexia was present in 34.8%. Ghrelin concentrations were positively correlated to obestatin levels ($r = 0.220$; $P = 0.022$). No relationships were observed between ghrelin, obestatin or ghrelin/obestatin ratio and obesity; however, when BMI was categorized into BMI < 20, 20–25, 25–30 and >30 kg/m², a significant trend was observed with ghrelin and ghrelin/obestatin ratio ($P = 0.024$ for both), but not with obestatin (Fig. 1).

Obestatin was not correlated to weight, neither to BMI, nor to the absolute or relative changes at 2-year follow-up. However, a trend was observed between obestatin and WC and also a significant association with ghrelin/obestatin ratio (Table 2). Obestatin correlated positively to the absolute difference between basal and 2-year WC ($r = 0.429$; $P < 0.001$) and relative difference between basal and 2-year WC ($r = 0.420$; $P < 0.001$); both absolute and relative WC difference remained significant after adjusting for age and BMI (Table 2 and Fig. 2). When obestatin was divided into quartiles, a significant lineal trend was observed

Table 2. Association between ghrelin, obestatin levels and ghrelin/obestatin ratio with metabolic parameters

	Ghrelin		Obestatin		Ghrelin/ obestatin	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Weight	−0.033	0.051	−0.013	0.892	−0.114	0.224
Absolute difference weight	0.001	0.990	0.088	0.429	−0.100	0.371
Relative difference weight	−0.037	0.742	0.064	0.563	−0.116	0.298
BMI	−0.155	0.113	0.107	0.273	−0.182	0.062
Absolute difference BMI	0.146	0.192	0.094	0.398	−0.013	0.298
Relative difference BMI	0.078	0.487	0.067	0.550	−0.045	0.688
WC	−0.145	0.139	0.165	0.090	−0.193	0.047
Absolute difference WC	0.166	0.134	0.429	<0.001	−0.171	0.123
Relative difference WC	0.142	0.199	0.420	<0.001	−0.178	0.108
Waist–hip ratio	−0.046	0.643	0.098	0.314	−0.092	0.350
IGF-I	0.272	0.004	0.025	0.797	0.294	0.002
Estradiol	−0.213	0.026	−0.066	0.493	−0.064	0.509
Insulin	−0.214	0.026	−0.070	0.467	−0.122	0.208
HOMA-IR	−0.151	0.123	−0.039	0.691	−0.097	0.322
TG	−0.232	0.017	0.073	0.456	−0.228	0.019
Triceps perimeter	−0.282	0.009	−0.007	0.950	−0.216	0.048
Triceps skinfold	−0.298	0.006	0.219	0.042	−0.387	<0.001

BMI, body mass index; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; WC, waist circumference. Bold values denotes statistical significance.

in relation to WC ($P = 0.049$), absolute and relative difference between basal and 2-year WC (both $P < 0.001$) (Fig. 3). Both ghrelin and ghrelin/obestatin ratios were associated with IGF-I levels, triglycerides and triceps perimeter (Table 2). Triceps skinfold was significantly correlated to ghrelin ($r = -0.298$; $P = 0.006$), obestatin ($r = 0.219$; $P = 0.042$) and ghrelin/obestatin ratio ($r = -0.387$; $P < 0.001$).

We also evaluated the possible influence of obestatin on food intake and anorexia. No association was observed between ghrelin or obestatin levels and MNA-SF, changes in MNA-SF or reported anorexia. However, a trend for significance with ghrelin and referred weight loss was found (1361.00 ± 559.84 ng/ml in weight loss subjects and 1028.17 ± 402.78 ng/ml in nonweight loss; $P = 0.084$). Also, a trend for significance with obestatin and >5% of weight loss at 2-year follow-up was observed (2.17 ± 0.45 ng/ml in weight loss and 1.90 ± 0.62 ng/ml in nonweight loss; $P = 0.073$).

In relation to MS, a significant association was found between ghrelin levels when categorized into quartiles (4th quartile vs 1st to 3rd quartiles) and as per component of MS: hypertriglyceridaemia (4.2% in 4th vs 31.7% in 1st to 3rd,

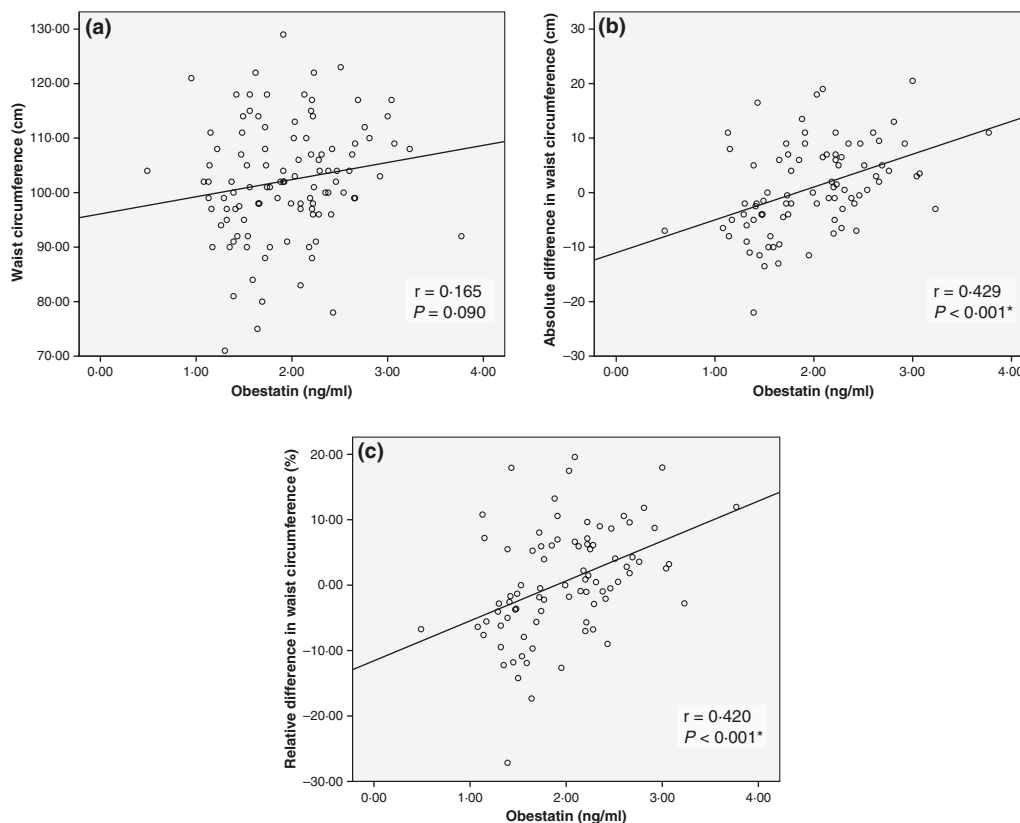


Fig. 2 Correlation between obestatin levels and waist circumference (WC) (Fig. 2a), absolute difference in WC (Fig. 2b) and relative difference in WC (Fig. 2c).

$P = 0.006$), low HDL levels (8.3% in 4th vs 31.7% in 1st to 3rd, $P = 0.022$), central obesity (80.8% in 4th vs 98.0% in 1st to 3rd, $P = 0.024$) and MS (41.7% in 4th vs 64.1% in 1st to 3rd, $P = 0.051$). When categorizing obestatin into quartiles (4th quartile vs 1st to 3rd quartiles), an association with glucose impairment was observed (69.0% in 4th vs 47.5% in 1st to 3rd, $P = 0.047$, after adjusting for age and BMI, $P = 0.098$) as well as with MS (77.8% in 4th vs 51.3% in 1st to 3rd, $P = 0.017$, after adjusting for age and BMI, $P = 0.046$, OR 2.90 (1.02–8.25) 4th vs 1st to 3rd) (Fig. 4). No association was found between ghrelin/obestatin ratio and MS components.

Ghrelin was significantly and negatively correlated with insulin ($r = -0.214$, $P = 0.026$) and HOMA-IR ($r = -0.151$, $P = 0.123$) (Table 2). A significant association was found between ghrelin and ghrelin/obestatin ratio with insulin or HOMA-IR when categorized into quartiles (4th quartile vs 1st to 3rd quartiles of insulin or HOMA-IR), but not with obestatin (Table 3).

We analysed the association between ghrelin, obestatin and ghrelin/obestatin ratio with estradiol. We found a significant correlation between ghrelin and estradiol ($r = -0.213$, $P = 0.026$), but no association with obestatin nor with ghrelin/obestatin ratio (Tables 1 and 2).

Discussion

Obestatin, one of the products of the ghrelin gene has been explored in the last decade both in human health and in disease

states, and also in animal models. Its participation in the regulation of energetic homeostasis and eating behaviour is less known in comparison with its older brother ghrelin, and opposing effects have been initially described for both products, in a way that ghrelin is orexigenic and obestatin may be anorexigenic.^{2,23} The latest reports do not confirm unequivocally these previous findings.^{7,24} In the present study, we evaluated the potential influence of obestatin on eating behaviour, anorexia and weight loss in old people. Anorexia is a frequent finding in ageing, which may contribute to its development owing to a loss of nutritional reserves; therefore, the attributed anorexigenic effects of obestatin make it a good candidate to be considered as an aetiological participant for the development of anorexia of ageing. We did not find any association of obestatin in our group of independently living old women to this effect, as obestatin did not correlate with anorexia, changes in risk of malnutrition development assessed by MNA-SF and loss of weight in a follow-up period of 2 years. As far as we know, no follow-up studies in humans have been performed so far, neither in young individuals nor in the elderly, which could demonstrate if this causal relationship may be really operative. Only cross-sectional studies have looked at the association of obestatin and obesity in humans and have found controversial results. For example, Vicennati⁸ reported high levels in obese women while Guo^{9,25} reported low levels. In anorexia, two different reports showed high levels of obestatin,^{10,11} which suggested that this ghrelin gene product may be an inhibitor of hunger. In some of these

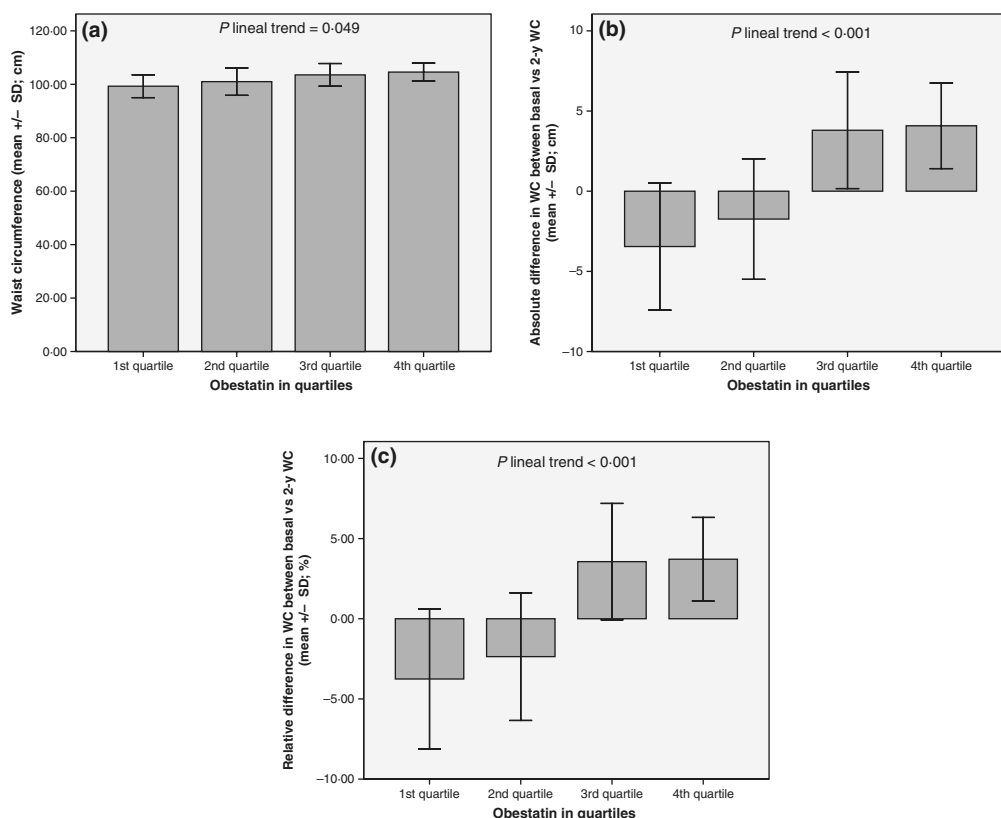


Fig. 3 Association between obestatin levels divided into quartiles and waist circumference (WC) (Fig. 3a), absolute difference in WC (Fig. 3b) and relative difference in WC (Fig. 3c) at the beginning and at 2-year follow-up.

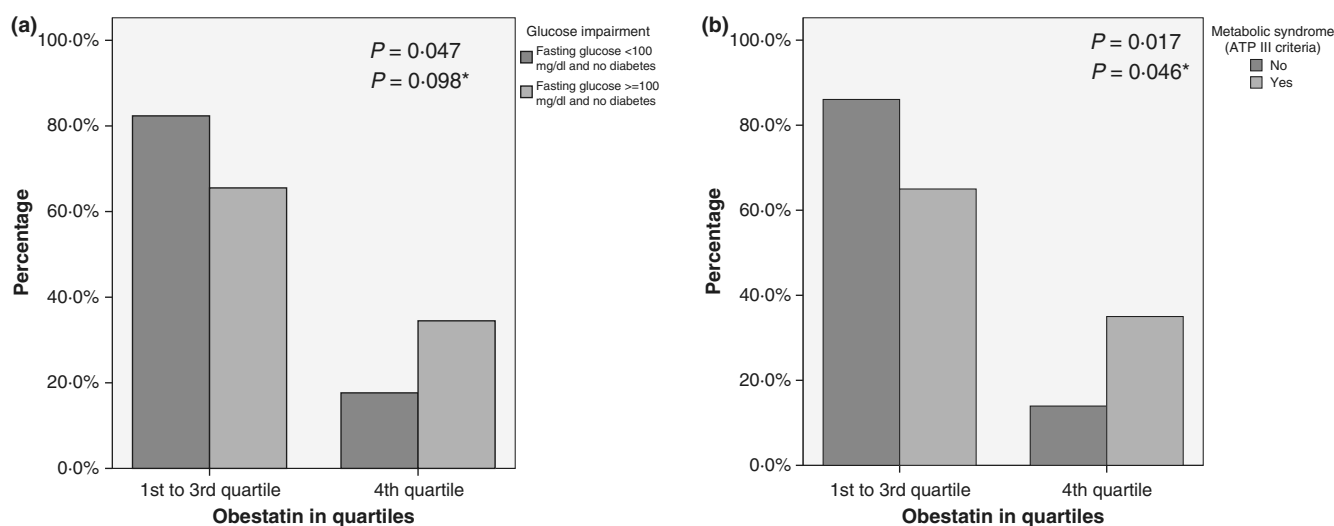


Fig. 4 Association between obestatin divided into quartiles (4th quartile vs 1st to 3rd quartile) and glucose impairment (Fig. 4a) and metabolic syndrome (Fig. 4b). *After adjusting for age and BMI

reports, a negative correlation was found with BMI. In the present study, we did not find a relationship of obestatin with weight or BMI, and moreover, there was no relationship between obestatin levels and weight loss at 2-year follow-up.

However, it is striking that in our subjects there was a significant correlation of obestatin with loss of abdominal circumference at follow-up, thus indicating that obestatin may have a certain influence on central adiposity, at least in women.

Table 3. Association between ghrelin, obestatin and ghrelin/obestatin ratio with insulin and homoeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) divided into quartiles

	Insulin		HOMA-IR	
	1st to 3rd quartiles	4th quartile	1st to 3rd quartiles	4th quartile
Ghrelin (pg/ml)				
Mean ± SD	1093.35 ± 424.52	891.71 ± 271.07	1076.91 ± 412.31	88.522 ± 275.41
<i>P</i>	0.005		0.027	
Obestatin (ng/ml)				
Mean ± SD	1.91 ± 0.58	1.99 ± 0.54	1.89 ± 0.58	2.00 ± 0.55
<i>P</i>	0.552		0.414	
Ghrelin/obestatin ratio				
Mean ± SD	612.65 ± 279.86	486.88 ± 239.80	611.08 ± 281.04	481.36 ± 243.68
<i>P</i>	0.036		0.035	

Bold values denotes statistical significance.

Therefore, as obestatin did not correlate at basal time point either with weight or with WC, this may suggest that the direction of the potential causal relationship would be that obestatin exerts an effect in the body composition in the abdominal region. Moreover, obestatin has been demonstrated to have an effect at the adipocyte level with a proadipogenic action.²⁶ Therefore, it could be speculated that weight loss and anorexia in old people may induce an increase in obestatin as a counterregulatory and potentially protective phenomenon. On the other hand, the association of high levels of obestatin in individuals in which a detrimental nutritional situation is happening on may also be explained by a loss of effect of obestatin. In fact, this 'loss of effect' condition of certain neuromediators, which is an ageing-related condition observed in different physiological systems, may apply not just for obestatin but also for ghrelin in old individuals. Regarding this, we did not find an association with hunger or appetite with ghrelin levels in old women – the described natural physiological effects in young people, which would express this age effect on the modification of feeding-related perceptions mediated by ghrelin gene products.

The difficulties in interpreting the results of published data in relation to the role of obestatin in food intake and body weight are evident. Different explanations have been proposed to explain these contradictory results: differences in the mode of administration of obestatin in experimental designs, the fact that obestatin seems to lack permeability at the blood–brain barrier level²⁷ and the short half-life of obestatin that might explain why some investigators are unable to observe these actions *in vivo*.² Lagaud suggested a U-shaped dose–response phenomenon for obestatin effects,²⁸ that *N*-terminal obestatin (residues 1–13) was reported to reduce food intake and body weight not found with middle and C-terminal obestatin²⁹ and that different levels of impurities in obestatin obtained from the suppliers³⁰ have been proposed as explanations for the controversial reports related to obestatin action. Several studies have hypothesized that a reduced expression of the ghrelin gene leads to a decrease in both ghrelin and obestatin in obesity in a maladaptive way that may further perpetuate the obesity state.²⁵ Our results could

partially be explained in such a way as we had a high prevalence of obesity and MS in our sample.

The correlation of ghrelin and obestatin levels also point to a common regulation of both gene products. The association of both ghrelin and obestatin levels with MS parameters is also interesting and confirms the role of ghrelin gene products in the regulation of metabolism. Vicennati *et al.*⁸ also found that obestatin correlated with some components of the MS; these investigators found that ghrelin/obestatin ratio was negatively associated with WC, as we did. They also found a negative correlation with HOMA and insulin, pointing also to a role in the regulation of metabolic balance. In the present study, glucose values were higher in those subjects with the highest quartile of obestatin, as well as the presence of MS. We also found higher levels of ghrelin and ghrelin/obestatin ratio in lowest quartile of insulin and HOMA, pointing to a negative correlation with insulin resistance. Moreover, a study in perinatal rat pancreas has shown a positive correlation between insulin and obestatin concentrations, suggesting the possibility that obestatin could play a role in the control of insulin secretion.³¹

The strengths of our study are that the sample is a homogeneous sample obtained from specific geographical area with a common cultural background that warrants a similar lifestyle and evaluated in a prospective manner. In addition, the phenotypical characterization of the subjects is quite extensive. However, our study also has several limitations. First, although it is a population-based study where noninstitutionalized individuals were selected, the inclusion of a younger sample of individuals would have overcome the problem of the overrepresentation of certain phenotypes because of survival bias. The number of included subjects was also restricted to the recruitment possibilities in the specific geographical areas involved in the study; a superior number of participants would have allowed a stronger statistical power. Moreover, these results are only referred to women, so that conclusion cannot be extrapolated to men. Additionally, the measurement of acylated ghrelin rather than total ghrelin, as well as amidated obestatin instead of total obestatin, would have helped a more in-depth explanation of potential relationships not found in our current methodology. In our

subjects sample, a high prevalence of MS and a high percentage of central obesity according to ATP-III criteria were found, which may have contributed to a bias.

In summary, obestatin is elevated in aged women bearing MS and seems to be associated with changes in WC, which could explain a possible role of obestatin in the control of adiposity. However, obestatin is not associated with other nutritional parameters, weight loss or anorexia.

Acknowledgements

This work was supported by Fondo Investigaciones Sanitarias Grant 07/0601. The authors have nothing to declare in relation to this article. Special thanks to Nicola Van Berckel for her English version of the manuscript.

Authors' contributions

M. Mora analysed data, wrote the manuscript and had primary responsibility for final content. M.L. Granada conducted research and provided essential materials. M. Roca conducted research and provided essential materials. E. Palomera designed and conducted research. R. Puig provided essential materials. M. Serra-Prat designed and conducted research. M. Puig-Domingo designed and conducted research, wrote the manuscript and had primary responsibility for final content.

References

- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., *et al.* (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**, 656–660.
- Zhang, J.V., Ren, P.G., vsian-Kretchmer, O., *et al.* (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science*, **310**, 996–999.
- Gualillo, O., Lago, F., Casanueva, F.F., *et al.* (2006) One ancestor, several peptides post-translational modifications of preproghrelin generate several peptides with antithetical effects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **256**, 1–8.
- Epelbaum, J., Bedjaoui, N., Dardennes, R., *et al.* (2010) Role of the ghrelin/obestatin balance in the regulation of neuroendocrine circuits controlling body composition and energy homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **314**, 244–247.
- Hassouna, R., Zizzari, P. & Tolle, V. (2010) The ghrelin/obestatin balance in the physiological and pathological control of growth hormone secretion, body composition and food intake. *Journal of Neuroendocrinology*, **22**, 793–804.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., *et al.* (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, **409**, 194–198.
- Nogueiras, R., Pfluger, P., Tovar, S., *et al.* (2007) Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology*, **148**, 21–26.
- Vicennati, V., Genghini, S., De, I.R., *et al.* (2007) Circulating obestatin levels and the ghrelin/obestatin ratio in obese women. *European Journal of Endocrinology*, **157**, 295–301.
- Guo, Z.F., Zheng, X., Qin, Y.W., *et al.* (2007) Circulating preprandial ghrelin to obestatin ratio is increased in human obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **92**, 1875–1880.
- Nakahara, T., Harada, T., Yasuhara, D., *et al.* (2008) Plasma obestatin concentrations are negatively correlated with body mass index, insulin resistance index, and plasma leptin concentrations in obesity and anorexia nervosa. *Biological Psychiatry*, **64**, 252–255.
- Monteleone, P., Serritella, C., Martiadis, V., *et al.* (2008) Plasma obestatin, ghrelin, and ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **93**, 4418–4421.
- Zizzari, P., Longchamps, R., Epelbaum, J., *et al.* (2007) Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology*, **148**, 1648–1653.
- Rigamonti, A.E., Pincelli, A.I., Corra, B., *et al.* (2002) Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *Journal of Endocrinology*, **175**, R1–R5.
- Serra-Prat, M., Fernandez, X., Burdoy, E., *et al.* (2007) The role of ghrelin in the energy homeostasis of elderly people: a population-based study. *Journal of Endocrinological Investigation*, **30**, 484–490.
- Serra-Prat, M., Alfaro, S.R., Palomera, E., *et al.* (2009) Relationship between ghrelin and the metabolic syndrome in the elderly: a longitudinal population-based study. *Clinical Endocrinology*, **70**, 227–232.
- Serra-Prat, M., Palomera, E., Roca, M., *et al.* (2010) Long-term effect of ghrelin on nutritional status and functional capacity in the elderly: a population-based cohort study. *Clinical Endocrinology*, **73**, 41–47.
- Puig-Domingo, M., Serra-Prat, M., Merino, M.J., *et al.* (2008) Muscle strength in the Mataro aging study participants and its relationship to successful aging. *Aging Clinical and Experimental Research*, **20**, 439–446.
- Rubenstein, L.Z., Harker, J.O., Salva, A., *et al.* (2001) Screening for undernutrition in geriatric practice: developing the short-form mini-nutritional assessment (MNA-SF). *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, **56**, M366–M372.
- Mahoney, F.I. & Barthel, D.W. (1965) Functional evaluation: the Barthel index. *Mayland State Medical Journal*, **14**, 61–65.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E. & McHugh, P.R. (1975) "Minimal state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*, **12**, 189–198.
- Hoyle, M.T., Alessi, C.A., Harker, J.O., *et al.* (1999) Development and testing of a five-item version of the Geriatric Depression Scale. *Journal of the American Geriatric Society*, **47**, 873–878.
- Anonymous. (2001) Executive summary of the Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, **285**, 2486–2497.
- Bresciani, E., Rapetti, D., Dona, F., *et al.* (2006) Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosterone secretion in the rat. *Journal of Endocrinological Investigation*, **29**, RC16–RC18.
- Seoane, L.M., Al-Massadi, O., Pazos, Y., *et al.* (2006) Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats. *Journal of Endocrinological Investigation*, **29**, RC13–RC15.
- Huda, M.S., Durham, B.H., Wong, S.P., *et al.* (2008) Plasma obestatin levels are lower in obese and post-gastrectomy subjects,

- but do not change in response to a meal. *International Journal of Obesity*, **32**, 129–135.
- 26 Gurriaran-Rodriguez, U., Al-Massadi, O., Roca-Rivada, A., et al. (2011) Obestatin as a regulator of adipocyte metabolism and adipogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **15**, 1927–1940.
- 27 Pan, W., Tu, H. & Kastin, A.J. (2006) Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin. *Peptides*, **27**, 911–916.
- 28 Lagaud, G.J., Young, A., Acena, A., et al. (2007) Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **357**, 264–269.
- 29 Nagaraj, S., Peddha, M.S. & Manjappara, U.V. (2008) Fragments of obestatin as modulators of feed intake, circulating lipids, and stored fat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **366**, 731–737.
- 30 De, S.B., Vergote, V., Pezeshki, A., et al. (2008) Impurity profiling quality control testing of synthetic peptides using liquid chromatography-photodiode array-fluorescence and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the obestatin case. *Analytical Biochemistry*, **376**, 229–234.
- 31 Chanoine, J.P., Wong, A.C. & Barrios, V. (2006) Obestatin, acylated and total ghrelin concentrations in the perinatal rat pancreas. *Hormone Research*, **66**, 81–88.

ORIGINAL 6:

Mora M, Granada ML, Palomera E, Serra-Prat M, Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group.

Obestatin is associated to muscle strength, functional capacity and cognitive status in old women.

Age (Dordr). 2013 Dec;35(6):2515-23.

Obestatin is associated to muscle strength, functional capacity and cognitive status in old women

Mireia Mora · María Luisa Granada ·
Elisabet Palomera · Mateu Serra-Prat ·
Manel Puig-Domingo ·
The Mataró Ageing Study Group

Received: 10 October 2012 / Accepted: 1 April 2013
© American Aging Association 2013

Abstract Obestatin has been proposed to have anorexigenic and anti-ghrelin actions. The objective was to study obestatin concentrations in relation to handgrip strength, functional capacity and cognitive state in old women. The prospective study included 110 women (age, 76.93 ± 6.32) from the Mataró Ageing Study. Individuals were characterized by anthropometric variables, grip strength, Barthel and assessment of cognitive

impairment [Mini Cognoscitive Examination (MCE) Spanish version], depressive status by the Geriatric Depression Scale (GDS) and frailty by the Fried criteria. Obestatin was measured by IRMA. Obestatin showed negative correlation to handgrip at basal time point ($r = -0.220$, $p = 0.023$) and at 2-year follow-up ($r = -0.344$, $p = 0.002$). Obestatin, divided into quartiles, showed a negative lineal association with handgrip: 11.03 ± 4.88 kg in first, 8.75 ± 4.08 kg in second, 8.11 ± 3.66 kg in third and 7.61 ± 4.08 kg in fourth quartile ($p = 0.018$). Higher obestatin levels were associated to increased weakness (categorized by handgrip of frailty criteria): 2.24 ± 0.42 ng/ml in weak vs. 1.87 ± 0.57 ng/ml in non-weak ($p = 0.01$). The decrease of either MCE or Barthel scores at 2-year follow-up was significantly higher in individuals in the fourth quartile of obestatin in comparison with individuals in the first quartile ($p = 0.046$ and $p = 0.019$, respectively). No association was found between obestatin and GDS score and neither with frailty as a condition. Obestatin is associated to low muscle strength, and impaired functional and cognitive capacity in old women participating in the Mataró Ageing Study.

The Mataró Ageing Study Group: Ayllón J, Buquet X, Bosch A, Burdoy E, Cademas I, Dordas J, Espinosa C, Falcón I, Gordillo M, Merino MJ, Mussoll J, Palomera E, Papiol M, Pous E, Pubill M, Puig J, Puig-Domingo M (Project co-director), Sanahuja J, Serra P, Serra-Prat M (Project co-director), Serrano C, Vilardebò A and Villarroya I.

M. Mora
Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital
Clínic i Universitari de Barcelona,
Barcelona, Spain

M. L. Granada
Department of Biochemistry, Hospital Universitari Germans
Trias i Pujol,
Badalona, Spain

E. Palomera · M. Serra-Prat
Research Unit and Ciberhep, Hospital de Mataró,
Mataró, Spain

M. Puig-Domingo (✉)
Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital
Universitari Germans Trias i Pujol,
Ctra. del Canyet, s/n,
08916 Badalona, Barcelona, Spain
e-mail: mpuigd@gmail.com

Keywords Obestatin · Muscle strength · Functional capacity · Cognition

Introduction

Obestatin (Zhang et al. 2005) is a gastrointestinal hormone which originates from the same precursor

as ghrelin (Kojima et al. 1999), the preproghrelin (Gualillo et al. 2006). Ghrelin is a well-known hormone with two major functions: to enhance the release of GH and to stimulate the hypothalamic ‘hunger centre’ (Rosicka et al. 2002; Wren et al. 2001). While ghrelin is mostly an orexigenic hormone which promotes appetite and increases food intake in humans (Nakahara et al. 2008; Wren et al. 2001), and activates gastrointestinal motility and gastric emptying, obestatin is believed to have the opposite effect, reducing food intake and gastric emptying and preventing body weight gain (Zhang et al. 2005). The role of obestatin has not been fully confirmed in humans, and some of its effects show no universal reproducibility (Nogueiras et al. 2007). Ghrelin gene products may be implicated in a complementary manner in energetic homeostasis and body weight control in which obestatin would play its role as an indirect modulator of the orexigenic action of ghrelin, although final demonstration of such relationship is still necessary.

GH and IGF-I decline is part of the ageing process and is probably etiologically involved in the changes in metabolism, body composition and functional capacity observed in old people (Ceda et al. 2005; Puig-Domingo et al. 2008). Moreover, a decline in plasma ghrelin with age has also been reported (Serra-Prat et al. 2007), and several groups, including ours, have investigated the role of ghrelin in the elderly in relation to metabolic syndrome (MS), hunger and satiety (Rigamonti et al. 2002; Serra-Prat et al. 2009a, b). Ghrelin circulating concentrations decline in old people may contribute to the phenomenon called ‘anorexia of ageing’ and influence nutritional impairment development. In addition, an association between ghrelin and its decline with ageing, muscle strength and functional capacity, probably mediated by GH-IGF-I axis, has also been described (Serra-Prat et al. 2010). However, no information is available concerning the role of obestatin in muscle strength and functional capacity in the elderly.

Ghrelin has also an extra-hypothalamic role, promoting learning and memory by activating plasticity in the hippocampus, enhancing reward and motivation and having a neuroprotective role (Andrews 2011). Interestingly, obestatin has also been observed to improve memory in rats (Carlini et al. 2007); however, little information is available related to the role it plays in memory and ageing in humans.

As previous studies have demonstrated that development of frailty over time is higher in women (Mora et al. 2012b), we were interested in studying the role of obestatin in women’s ageing. The purpose of the present study was to investigate if obestatin circulating concentrations are related to ageing phenotype in a cohort of non-institutionalized old women at baseline and after 2-year follow-up period.

Subjects and methods

Study population

All subjects of the present study were participating in the Mataró Ageing Study, a population-based prospective cohort study designed to identify risk factors for frailty and successful ageing condition among old people. The study group was selected from the inhabitants of Mataró and Argentona (Barcelona, Spain), and has previously been described elsewhere (Puig-Domingo et al. 2008). Among the 313 individuals who participated in the Mataró Ageing Study, 160 were women. One hundred and ten women from this cohort, in which all data collection and biological samples for obestatin were available, were finally included. The Ethic Committee of the Consorci Sanitari of Maresme approved the study protocol, and all subjects signed an informed consent before entering.

Data collection

A geriatric assessment was performed by a specialized team composed of ten general practitioners specifically trained in evaluating the aged condition. This assessment was carried out in two Primary Health Care centres, and it comprised of a physical examination and questionnaires to evaluate cognitive, nutritional, depression status and functional capacity as per the study protocol.

According to the study protocol, a review of the electronic medical history of the individual and/or a first-time evaluation in case of no previous registration at the Consorci Sanitari of Maresme medical history database was done at the start of the study. Chronic and previous diseases, life style factors, education and physical examination were recorded. Blood samples were collected, biochemical and hormonal

determinations were performed and results were recorded in the database.

Grip strength was measured at the non-dominant hand using a handheld dynamometer (Jamar model). Guralnik index and the unipodal balance test (good balance was considered when participants could stand on one foot for 5 s or more) were performed to assess functional capacity. Functional capacity was also evaluated by determining Barthel score (Mahoney and Barthel 1965) and considered optimal when score = 100. The Spanish version of the Mini Mental State Examination [Mini Cognitive Examination (MCE) Spanish version] was used to assess cognitive function; subjects with ≥ 24 points were considered as having no deterioration of the cognitive function (Lobo et al. 1999). Depressive status was evaluated performing the Spanish version of the Geriatric Depression Scale (GDS; Fernandez-San et al. 2002). Frailty was evaluated by using the Fried criteria (Fried et al. 2001) and according to this definition; frailty was present if three or more of the following conditions were present: unintentional weight loss (4.5 kg in the past year), self-reported exhaustion, weakness (by grip strength measurement), slow walking speed and low physical activity.

Hormonal measurements

Blood samples for all measurements were obtained after a 12-h night time fasting period. Glucose and lipids were analysed by enzymatic techniques. Serum was obtained after centrifugation and stored in aliquots at -70°C until assayed. Serum obestatin was measured by a commercially available enzyme immunoassay (YK231 Human Obestatin EIA, Yanaihara Institute, Fujinomiya-SHI, Shizuoka, Japan). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.62 % and 7.3 %, respectively. The detection limit of the assay was 0.231 ng/mL. As ghrelin, IGF-I and 25-hydroxy-vitamin D have shown to be related to obestatin in previous studies, these were also measured in the present investigation and used if necessary as confounders for multivariate analysis. Total plasma ghrelin concentrations were measured with a human radioimmunoassay (RIA) kit (Linco Research Inc., St. Charles, MO, USA). The detection limit was 93 pg/mL with intra- and inter-assay variation coefficients of 11.1 % and 14.7 %, respectively. Total IGF-I was measured by using a two-side immunoradiometric

assay [Immunotech IGF-I kit, Immunotech-Beckman, Marseille, France; intra-assay variation coefficients (CV), <6.3 %; inter-assay CV, 6.8 %; sensitivity, 30 ng/ml]. Plasma 25-hydroxy-vitamin D concentration was measured using the LIAISON 25 OH vitamin D total assay (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, USA), a competitive chemiluminescent immunoassay with the LIAISON DiaSorin automated analyzer. Intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) were <6.3 % and 9.1 %, respectively, and the assay sensitivity was 4 ng/mL.

Data analysis

Categorical variables were expressed as percentages, and continuous data as mean (standard deviation). Kolmogorov–Smirnov test was used to assess normality of continuous variables. To compare means, *t* Student's test, Mann–Whitney *U* or ANOVA was used. Association of continuous variables was evaluated by using Pearson or Spearman correlations; multiple regressions and lineal regression analysis were used to adjust the variables when correlation was significant in the univariate analysis. Categorical variables were studied using Chi-square test. We considered statistical significance for association with a *p* value <0.05.

Results

Subject characteristics and obestatin hormonal relationships

One hundred and ten women with an age ranging from 69.41 to 101.14 were evaluated at basal time point. At 2-year follow-up, four women had died, and the other 20 were not available for evaluation (3 were not found, 11 did not accept to participate in the follow-up and 6 had logistical problems to attend the research site). Characteristics of individuals at first visit and at follow-up are described in Table 1. Forty-eight per cent of women were illiterate, 50.5 % were married and 43 % were widowed; 28 % lived alone, 40.2 % with their husbands, 11.2 % with their husband and offspring, and 16.8 % only with their offspring; 49.5 % presented with some visual impairment and 32.7 % with some deafness; and 93.5 % had never smoked. In our sample of women of the Mataró

Ageing Study, mean obestatin levels were 1.93 ± 0.57 ng/ml (0.49–3.77); mean IGF-I, 100.61 ± 31.04 ng/ml (36–193); mean ghrelin, $1,041 \pm 399.62$ pg/ml (465–2,477) and mean 25-hydroxy-vitamin D, 16.51 ± 8.02 ng/ml (5.30–41.70). Obestatin was positively correlated to ghrelin levels ($r=0.220$, $p=0.022$), and IGF-I was positively associated to ghrelin ($r=0.272$, $p=0.004$); however, no association was found between obestatin and IGF-I ($r=0.025$, $p=0.797$). No association was found between IGF-I, obestatin or ghrelin levels and age. 25-Hydroxy-vitamin was correlated to age ($r=-0.345$, $p<0.001$) but not with ghrelin, obestatin and IGF-I.

Muscle strength and obestatin

Table 1 shows the changes of muscle strength measurements over time. Handgrip was correlated to IGF-I ($r=0.189$, $p=0.051$) and age ($r=-0.350$, $p<0.001$), but no association was found with vitamin D levels. Obestatin was negatively correlated to handgrip at first evaluation ($r=-0.220$, $p=0.023$). As a univariate

association was found between handgrip and age, and handgrip with IGF-I, we used multiple regression to adjust obestatin association with handgrip. After adjusting for age and IGF-I, obestatin remained significantly associated to handgrip (beta= -0.263 , $p=0.003$, $R^2=0.237$). We also found an association between handgrip at 2 years follow-up and obestatin ($r=-0.344$, $p=0.002$; after adjustment, beta= -0.352 , $p=0.001$, $R^2=0.232$; Fig. 1). When obestatin was divided into quartiles (first quartile, <1.49 ng/ml; second quartile, $1.49-1.91$ ng/ml; third quartile, $1.91-2.98$ ng/ml and fourth quartile, ≥ 2.98 ng/ml), a statistically significant negative lineal association was observed in relation to handgrip: 11.03 ± 4.88 kg in first quartile, 8.75 ± 4.08 kg in second quartile, 8.11 ± 3.66 kg in third quartile and 7.61 ± 4.08 kg in fourth quartile ($p=0.018$), being the difference between first and fourth quartile also significant ($p=0.007$, $p=0.003$ after adjusting for age and IGF-I, $R^2=0.236$; Fig. 2a). Similar results were found in relation to handgrip at 2 years follow-up: 10.92 ± 3.86 kg in first quartile, 9.56 ± 3.62 kg in second quartile, 7.07 ± 3.25 kg in

Table 1 Characteristics of sample at first and second visit

	First visit (basal), <i>n</i> =110	First visit (basal), <i>n</i> =86 (with follow-up)	Second visit (follow-up), <i>n</i> =86	<i>p</i>
Age	76.93±6.32	76.97±5.92	79.21±5.91	<0.001
Co-morbidities				
Depression	31.8 %	29.3 %	31.4 %	0.924
Cancer	12.1 %	12.9 %	11.6 %	0.908
Arthrosis	72 %	71.8 %	82.6 %	0.116
Chronic lung disease	11.2 %	10.6 %	10.5 %	0.940
Asthma	8.4 %	5.9 %	7 %	0.925
Diabetes	27.1 %	22.4 %	24.4 %	0.792
Hypertension	56.1 %	54.1 %	65.1 %	0.259
Stroke	15 %	12.9 %	11.6 %	0.631
Ischaemic heart disease	11.2 %	9.4 %	15.1 %	0.553
Falls (last 12 months)	30.8 %	31.8 %	37.2 %	0.430
Hours walking outdoor	2.16±7.13	2.06±7.33	0.66±0.74	0.090
Guralnik	8.44±2.11	8.54±2.10	7.26±5.91	<0.001
Barthel	95.90±5.22	96.43±5.00	94.24±7.34	<0.001
GDS	1.57±1.37	1.54±1.44	1.29±1.38	0.105
MCE	28.39±6.05	28.95±5.53	27.80±5.34	0.001
Handgrip (kg)	9.55±4.46	9.12±4.54	8.69±3.94	0.028
Strength in left leg 120° (kg)	94.60±39.01	94.10±41.58	91.11±32.83	0.550
Strength in right leg 120° (kg)	95.92±35.08	94.64±36.51	104.34±36.47	0.029

Bolded values mean they have statistical significance

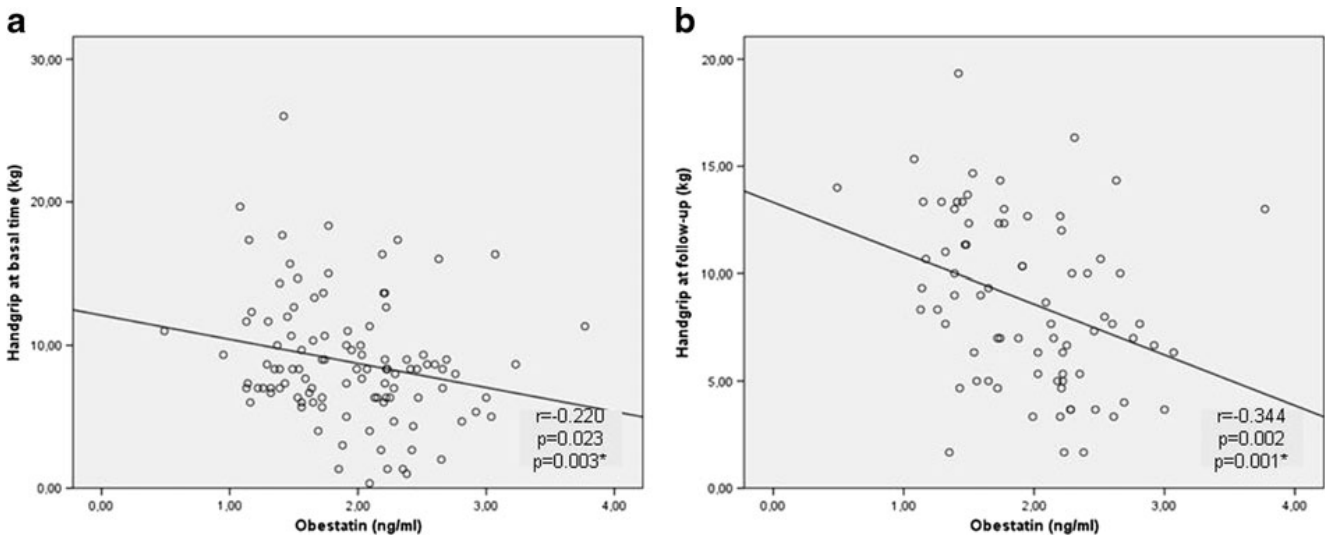


Fig. 1 Correlation between obestatin (nanograms per millilitre) and handgrip at basal time (**a**) and handgrip at follow-up (**b**). After adjusting for age and IGF-I, obestatin remained significantly associated to handgrip both at basal

time (beta=-0.263, $p=0.003$, $R^2=0.237$) and at 2 years follow-up and obestatin ($r=-0.344$, $p=0.002$; after adjustment, beta=-0.352, $p=0.001$, $R^2=0.232$)

third quartile and 7.45 ± 3.86 kg in fourth quartile, being the difference between first and fourth quartile significant ($p=0.006$, $p=0.010$ after adjusting for age and IGF-I, $R^2=0.192$; Fig. 2b).

Higher obestatin levels were associated to pathological handgrip according to frailty criteria: 2.24 ± 0.42 ng/ml in weak handgrip vs. 1.87 ± 0.57 ng/ml in non-weak ($p=0.01$). No significant differences in obestatin levels were observed in relation to the presence of frailty either at first evaluation or at follow-up (2.24 ± 0.71 ng/ml in frail vs. 1.94 ± 0.60 ng/ml in non-frail, and at 2 years, 2.03 ± 0.52 ng/ml in frail vs. 1.93 ± 0.66 ng/ml in non-frail). Pathological handgrip was

associated to obestatin [47.4 % in fourth quartile vs. 0 % in first quartile, $p=0.022$; lineal association, $p=0.004$; OR, 9.16 (2.32–36.18; $p=0.002$) between fourth vs. first after adjusting for age and IGF-I, $R^2=0.191$]. Obestatin concentrations at basal time point were not associated to loss of handgrip over time ($r=-0.010$, $p=0.935$).

Functional status and frailty

Table 1 shows the evolution of functional capacity measurements over time. No association was found between baseline obestatin concentrations and absolute

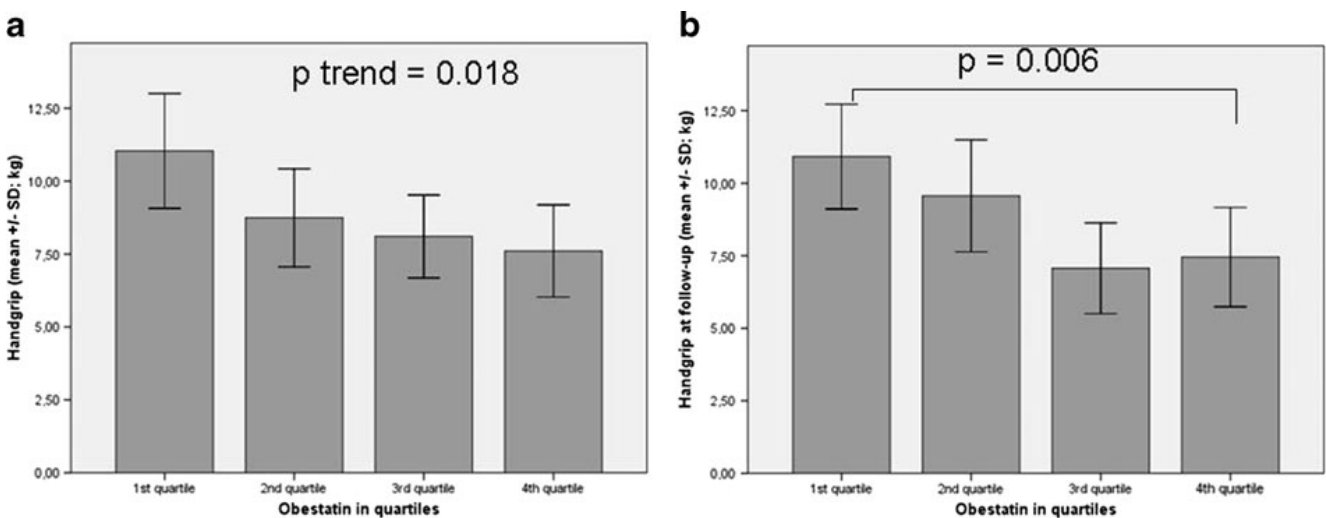


Fig. 2 Association between obestatin in quartiles and handgrip at basal time (**a**) and handgrip at follow-up (**b**)

values of MCE, Barthel, Guralnik, unipodal balance test or GDS and obestatin, either at the beginning or at follow-up. Absolute and relative decreases in MCE were significantly higher in individuals in the fourth quartile of obestatin in comparison with individuals in the first quartile (relative decrease, 7.25 ± 12.03 % in fourth quartile vs. -0.09 ± 10.48 % in first quartile; $p=0.046$). Moreover, absolute and relative decreases in Barthel score were also significantly higher in individuals in the fourth quartile of obestatin in comparison with individuals in the first quartile (relative decrease, 3.77 ± 5.77 % in fourth quartile vs. 0.46 ± 3.19 % in first quartile; $p=0.019$). Absolute or relative modifications of Guralnik, unipodal balance test and GDS values were not related to obestatin concentrations.

In relation to frailty according to Fried criteria, 0.9 % fulfilled the first criteria (weight loss), 17.9 % the second criteria (exhaustion), 17.8 % had pathological handgrip strength, 28 % had low gait speed and 36.8 % had poor physical activity. Thus, 40 % of women had not one single frailty condition, 25.5 % had one, 27.3 % had two and 7.3 % had three; therefore, 7.3 % of women were frail according to Fried criteria at initial evaluation, while 34.5 % were frail at 2 years of follow-up. Frailty development according to Fried criteria was not associated to obestatin, while it was with basal IGF-I concentrations (89.07 ± 30.6 ng/ml in frail developers vs. 113.18 ± 30.21 ng/ml in non-frail developers; $p=0.01$).

Discussion

Obestatin, one of the two main products of the ghrelin gene, has been discovered and begun to be studied after a decade of investigation mostly devoted to ghrelin (Gualillo et al. 2006). Both in human health and disease states, as well as in animal models, obestatin seems to exert different effects in comparison to ghrelin. Its participation in the regulation of energetic homeostasis in humans has been suggested, and initial data pointed towards the idea that obestatin was driving an anorexigenic message in contraposition to the orexigenic effect of ghrelin. However, various recent studies have shown conflictive results regarding this (Nakahara et al. 2008; Nogueiras et al. 2007; Zhang et al. 2005; Zizzari et al. 2007). In a recent study, we found that obestatin was not associated to weight loss or diminished appetite or decreased eating

behaviour frequently observed in the ageing phenomenon and referred to as anorexia of aged people (Mora et al. 2012a). As ghrelin has important interactions with the somatotrophic axis, it could be interesting to explore whether these pro-somatotropic and therefore anabolic effects of ghrelin may be counteracted or influenced by obestatin. Recent studies have shown that obestatin does modulate ghrelin actions and thus reversing its excitatory effects on hypothalamic GHRH neurons (Feng et al. 2011). As there are few predictive biomarkers of frailty development or loss of function whilst ageing, in the present work, we aimed to investigate if obestatin was associated to components of frailty condition or was able to predict frailty as a geriatric syndrome in the group of women participating in the Mataró Ageing Study. We found that muscle strength was diminished in those individuals with higher circulating obestatin at initial evaluation and at 2 years follow-up, independently of IGF-I circulating levels. No individuals with decreased handgrip strength or other components of frailty condition had obestatin levels in the first quartile. Moreover, impaired evolution of either mental state or functional capacity assessed by MCE and Barthel scores were observed more frequently at follow-up in individuals in the fourth quartile of obestatin. The overall data of the present study indicate that high obestatin may be considered as a biological marker of loss of health status over time in women older than 75 years, at least in our population, and among other biomarkers. Ghrelin has been considered as an anabolic hormone for its ability to promote the activation of somatotrophic axis activity and to stimulate orexigenic behaviour. These actions are thought to be performed by the so-called active form of the ghrelin molecule, acyl ghrelin, which is the only ghrelin isoform able to bind the GHSR1a receptor, while des-acyl ghrelin, the much more abundant ghrelin circulating isoform, is not able to bind this receptor. By virtue of these effects, we previously showed that individuals with higher circulating ghrelin had a better handgrip while ageing (Serra-Prat et al. 2010). However, the mechanisms by which ghrelin may influence muscle function may not only be related to an indirect endocrine action GH-mediated. It has recently been described that ghrelin, either acyl and des-acyl ghrelin, may act at the muscle level through direct mechanisms not involving GHSR1a receptor which is not present in myocytes (Baldanzi et al. 2002; Filigheddu et al. 2007;

Gnanapavan et al. 2002; Sheriff et al. 2012). Filigheddu et al. (2007) have shown that both ghrelin and des-acyl ghrelin stimulate tyrosine phosphorylation of several muscle proteins and activate ERK-1/2 and Akt, indicating that both ghrelin isoforms could exert a biological activity on muscle cells. These results strongly suggest that these actions at the muscle level are mediated by a yet unidentified receptor, common to both acylated and unacylated peptide and distinct from GHSR1a and reinforces similar evidence for common receptors for ghrelin isoforms previously reported in several cells, including a cardiomyocyte-derived cell line (Baldanzi et al. 2002).

All these data may explain that individuals with higher circulating ghrelin levels may have better muscle functional capacity reflected by a better muscle strength. Interestingly, we found that, conversely, individuals with high levels of obestatin were those that performed worse in terms of muscle strength, thus pointing towards the proposed opposite actions of obestatin in relation to ghrelin, which at least seems to be confirmed with respect to muscle strength. Whether obestatin has its own mechanisms of direct action upon muscle cells or acts through modulating ghrelin effects at the myocyte level is yet to be established. The latter may be probably more plausible as all data published on obestatin physiology seems to indicate that obestatin is more a ghrelin regulator rather than a peptide with true hormonal properties (Garg 2007), although a potential interaction with this yet unidentified ghrelin receptor cannot be completely discarded.

This detrimental action of obestatin on muscle function expressed as reduced muscle strength in individuals with highest obestatin quartile is extended to other relevant functions whilst ageing, as exemplified by the findings of the present study of impaired mental and functional capacity over time in those particular subjects bearing obestatin in the upper range. Little is known about the role of obestatin in cognition, as opposed to ghrelin where there is more information available (Frago et al. 2011). Experimental studies in rats have demonstrated the neuroprotective role of ghrelin (Carlini et al. 2002, 2004), as well as of obestatin (Carlini et al. 2007). In humans, little data is available in relation to the influence of both ghrelin and obestatin in cognitive function. The only study

published so far in the elderly showed a negative correlation between ghrelin and cognitive domains, just the opposite of what was found in experimental studies (Spitznagel et al. 2010). We have obtained similar results in relation to obestatin, as women in the highest quartile of obestatin showed a higher loss in MCE.

Why these findings are not seen in younger individuals warrant further studies to clarify this opposed behaviour of the ghrelin gene products. A coherent explanation would be that loss of ghrelin action in old people over time would lead to a net increase in the negative modulation of obestatin on ghrelin effects; however, this possibility, as well as others, remains very speculative at present. Finally, although a causal participation of the ghrelin/obestatin binomium in the development of frailty condition while ageing is an attractive possibility, all these findings may just correspond to epiphenomena of the ageing process itself.

Other biological markers associated to deterioration of health, probably even more potent than ghrelin/obestatin, have also been confirmed in our study; specifically, low IGF-I identified quite robustly subjects at risk of functional and mental impairment, as well as those with a pathologic handgrip at follow-up.

The strengths of our study are that the sample is a homogeneous one obtained from a specific geographical area with a common cultural background that warrants a similar lifestyle and evaluated in a prospective manner. In addition, the phenotypic characterization of the subjects is quite extensive. However, our study also has several limitations. First, although it is a population-based study where non-institutionalized individuals were selected, the inclusion of a younger sample of subjects would have overcome the problem of the overrepresentation of certain phenotypes due to survival bias. The number of subjects included was also restricted to the recruitment possibilities in the specific geographical areas involved in the study; a higher number of participants would have allowed a stronger statistical power. Moreover, these results are only referred to women, so that conclusion cannot be extrapolated to men. Additionally, the measurement of acylated ghrelin rather than total ghrelin, as well as amidated obestatin instead of total obestatin, would have helped a more in-depth explanation of potential relationships not found with our current methodology.

In summary, we found that obestatin is associated to low muscle strength and impaired functional and

cognitive capacity in old women participating in the Mataró Ageing Study. The mechanistic explanation of this association and the apparent opposite actions of these two peptides derived from the ghrelin gene require further in-depth studies for its characterization.

Acknowledgments This work was supported by Fondo Investigaciones Sanitarias Grant 07/0601. The authors have nothing to declare in relation to this article. Special thanks to Nicky Van Berckel for her English version of the manuscript.

References

- Andrews ZB (2011) The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *Trends Neurosci* 34:31–40
- Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani A (2002) Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159:1029–1037
- Carlini VP, Monzon ME, Varas MM, Cragolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, de Barioglio Sr (2002) Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 299:739–743
- Carlini VP, Varas MM, Cragolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, de Barioglio Sr (2004) Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem Biophys Res Commun* 313:635–641
- Carlini VP, Schioth HB, Debarioglio SR (2007) Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 352:907–912
- Ceda GP, Dall'Aglia E, Maggio M, Lauretani F, Bandinelli S, Falzoi C, Grimaldi W, Ceresini G, Corradi F, Ferrucci L, Valenti G, Hoffman AR (2005) Clinical implications of the reduced activity of the GH-IGF-I axis in older men. *J Endocrinol Invest* 28:96–100
- Feng DD, Yang SK, Loudes C, Simon A, Al-Sarraf T, Culler M, Vear-Perez R, Llorens-Cortes C, Chen C, Epelbaum J, Gardette R (2011) Ghrelin and obestatin modulate growth hormone-releasing hormone release and synaptic inputs onto growth hormone-releasing hormone neurons. *Eur J Neurosci* 34:732–744
- Fernandez-San MM, Andrade-Rosa C, Molina JD, Munoz PE, Carretero B, Rodriguez M, Silva A (2002) Validation of the Spanish version of the Geriatric Depression Scale (GDS) in primary care. *Int J Geriatr Psychiatry* 17:279–287
- Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M, Porporato PE, Taulli R, Traini S, Baldanzi G, Chianale F, Cutrupi S, Arnoletti E, Ghe C, Fubini A, Surico N, Sinigaglia F, Ponzetto C, Muccioli G, Crepaldi T, Graziani A (2007) Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell* 18:986–994
- Frago LM, Baquedano E, Argente J, Chowen JA (2011) Neuroprotective actions of ghrelin and growth hormone secretagogues. *Front Mol Neurosci* 4:23
- Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, Seeman T, Tracy R, Kop WJ, Burke G, McBurnie MA (2001) Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:M146–M156
- Garg A (2007) The ongoing saga of obestatin: is it a hormone? *Clin Endocrinol Metab* 92:3396–3398
- Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2988
- Gualillo O, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C (2006) One ancestor, several peptides post-translational modifications of preproghrelin generate several peptides with antithetical effects. *Mol Cell Endocrinol* 256:1–8
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656–660
- Lobo A, Saz P, Marcos G, Dia JL, de la Cámara C, Ventura T, Morales AF, Fernando PL, Montanes JA, Aznar S (1999) [Revalidation and standardization of the cognition mini-exam (first Spanish version of the Mini-Mental Status Examination) in the general geriatric population]. *Med Clin (Barc)* 112:767–774
- Mahoney FI, Barthel DW (1965) Functional evaluation: the Barthel index. *Md State Med J* 14:61–65
- Mora M, Granada ML, Roca M, Palomera E, Puig R, Serra-Prat M, Puig-Domingo M (2012a) Obestatin does not modify weight and nutritional behaviour but is associated with metabolic syndrome in old women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. doi:10.1111/j.1365-2265.2012.04489.x
- Mora M, Sánchez L, Serrat-Prat M, Palomera E, Blanco J, Aranda G, Falcón I, Cadenas I, Boquet X, Oriola J, Puig-Domingo M (2012b) Hormonal determinants and effect of ER22/23EK glucocorticoid receptor gene polymorphism on health status deterioration in the participants of the Mataró Aging Study. *Age (Dordr)* 34:553–561
- Nakahara T, Harada T, Yasuhara D, Shimada N, Amitani H, Sakoguchi T, Kamiji MM, Asakawa A, Inui A (2008) Plasma obestatin concentrations are negatively correlated with body mass index, insulin resistance index, and plasma leptin concentrations in obesity and anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* 64:252–255
- Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, Arnold M, Mitchell S, Morris A, Perez-Tilve D, Vazquez MJ, Wiedmer P, Castaneda TR, DiMarchi R, Tschop M, Schurmann A, Joost HG, Williams LM, Langhans W, Dieguez C (2007) Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 148:21–26
- Puig-Domingo M, Serra-Prat M, Merino MJ, Pubill M, Burdoy E, Papiol M (2008) Muscle strength in the Mataro aging study participants and its relationship to successful aging. *Aging Clin Exp Res* 20:439–446
- Rigamonti AE, Pincelli AI, Corra B, Viarengo R, Bonomo SM, Galimberti D, Scacchi M, Scarpini E, Cavagnini F, Muller EE (2002) Plasma ghrelin concentrations in elderly

- subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol* 175:R1–R5
- Rosicka M, Krsek M, Jarkovska Z, Marek J, Schreiber V (2002) Ghrelin—a new endogenous growth hormone secretagogue. *Physiol Res* 51:435–441
- Serra-Prat M, Fernandez X, Burdoy E, Mussoll J, Casamitjana R, Puig-Domingo M (2007) The role of ghrelin in the energy homeostasis of elderly people: a population-based study. *J Endocrinol Invest* 30:484–490
- Serra-Prat M, Alfaro SR, Palomera E, Casamitjana R, Buquet X, Fernandez-Fernandez C, Puig-Domingo M (2009a) Relationship between ghrelin and the metabolic syndrome in the elderly: a longitudinal population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 70:227–232
- Serra-Prat M, Palomera E, Clave P, Puig-Domingo M (2009b) Effect of age and frailty on ghrelin and cholecystokinin responses to a meal test. *Am J Clin Nutr* 89:1410–1417
- Serra-Prat M, Palomera E, Roca M, Puig-Domingo M (2010) Long-term effect of ghrelin on nutritional status and functional capacity in the elderly: a population-based cohort study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 73:41–47
- Sheriff S, Kadeer N, Joshi R, Friend LA, James JH, Balasubramaniam A (2012) Des-acyl ghrelin exhibits pro-anabolic and anti-catabolic effects on C2C12 myotubes exposed to cytokines and reduces burn-induced muscle proteolysis in rats. *Mol Cell Endocrinol* 351:286–295
- Spitznagel MB, Benitez A, Updegraff J, Potter V, Alexander T, Glickman E, Gunstad J (2010) Serum ghrelin is inversely associated with cognitive function in a sample of non-demented elderly. *Psychiatry Clin Neurosci* 64:608–611
- Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR (2001) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5992
- Zhang JV, Ren PG, Vsián-Kretschmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310:996–999
- Zizzari P, Longchamps R, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT (2007) Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 148:1648–1653

Authors' contributions

M. Mora analysed the data, wrote the paper and had primary responsibility for final content. M.L. Granada conducted research and provided essential materials. E. Palomera analysed the data. M. Serra-Prat designed and conducted research. M. Puig-Domingo designed and conducted research, wrote the paper and had primary responsibility for final content.

ORIGINAL 7:

Mora M, Serra-Prat M, Palomera E, Puig-Domingo M; the Mataró Ageing Study Group.

Metabolic and hormonal contributors to survival in the participants of the Mataró Ageing Study at 8 years follow-up.

Clin Endocrinol (Oxf). 2014 Nov;81(5):775-83.

ORIGINAL ARTICLE

Metabolic and hormonal contributors to survival in the participants of the Mataró Ageing Study at 8 years follow-up

Mireia Mora*, Mateu Serra-Pratt, Elisabet Palomerat, and Manel Puig-Domingo‡ the Mataró Ageing Study Group¹

*Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clínic i Universitari of Barcelona, Barcelona, †Research Unit and Ciberhep, Hospital de Mataró, Mataró and ‡Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

Summary

Objective Ageing is a physiological process that may be influenced by genetic factors as well as metabolic and hormonal determinants. The aim was to describe metabolic and hormonal factors related to survival in the cohort of non-institutionalized people aged >70 years old of the Mataró Ageing Study.

Design and methods 313 individuals were included and followed-up during 8 years. Metabolic syndrome (MS) parameters by International Diabetes Federation and ATP-III as well as hormonal factors (TSH, free-T4, growth hormone, IGF-I, ghrelin, cortisol, dehydroepiandrosterone –DHEA–, DHEAs, testosterone, SHBG, estradiol, estrone, cortisol/DHEA and cortisol/DHEAs) were studied and their relationship with survival was assessed.

Results At 8 year of follow-up, 96 out of 313 subjects (30.7%) died. No association between MS and its components and survival was found. However, when abdominal perimeter was analyzed according to distribution in quartiles and categorized by gender, the lowest and highest quartile showed higher mortality ($P = 0.009$; waist circumference (WC) between 98–102 cm in men and 95–102 cm in women were associated to lower mortality). In men, IGF-I, estrone, cortisol/DHEA ratio and cortisol/DHEAs ratio were lower in survivors, and in women, growth hormone and ghrelin were higher in survivors and cortisol/DHEAs ratio was lower. When Cox regression was performed for survival analysis of the whole cohort (adjusting by age, gender, tobacco consumption and WC, cortisol ($B = 0.036$, $P = 0.033$), estrone ($B = 0.014$, $P = 0.004$) and cortisol/DHEA

ratio ($B = 0.018$, $P = 0.008$) were significantly associated to mortality. Sequential adjustments including additionally in the model Lawton scale, MiniNutritional Assessment and MCE showed significant association to estrone ($P = 0.018$).

Conclusions Waist circumference in a U-shaped relationship, together with hormonal factors (adrenal steroids and somatotrophic axis) influenced survival in individuals participating in Mataró Ageing Study.

(Received 24 December 2013; returned for revision 12 January 2014; finally revised 31 March 2014; accepted 4 April 2014)

Introduction

Ageing is a heterogeneous physiological process characterized by functional decline, decreased capacity to control basal homeostasis and increased susceptibility to disease and disability.¹ Some individuals have significant age-related alterations in their physiological functions that lead to fragility, comorbidity and disability while others have a healthy condition, with a robust senescence and a successful ageing situation. The prevalence of robust elderly reported in different studies shows a relatively wide range from 12 to 30–49%;^{2,3} declining to 18% in older than 90 years.⁴ This may be explained by the contribution of different combinations of genetic factors, healthy lifestyles, accessibility to medical care and a physically and socially active life. Epigenetic factors are additional contributors to life expectancy and successful ageing and represent a drawbridge across genetic, environmental and stochastic factors.⁵ Several phenotypic characteristics strongly predict disability and mortality in ageing, the most representative being the increase in fat mass, the loss of muscle mass and strength, and the decrease in bone mineral density.⁶ Other conditions such as impaired mental function and lack of social support are also very important. From an endocrinological perspective, over the last decade numerous studies have paid attention to the importance of hormonal profiles as relevant factors influencing mortality and survival in aged individuals.^{7,8} In fact, change in body composition, loss of muscle strength, anorexia observed in elders and decline in men-

Correspondence: Manel Puig-Domingo, Service of Endocrinology and Nutrition, Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital Germans Trias i Pujol, Can Ruti Campus, Ctra. del Canyet, s/n, 08916 Badalona, Spain. Tel.: 00 34 934 651 200; E-mails: mpuigd@gmail.com; mpuigd@igtp.cat

¹The Mataró Ageing Study Group: Ayllón J, Buquet X, Bosch A, Burdoy E, Cademas I, Dordas J, Espinosa C, Falcón I, Gordillo M, Merino MJ, Mussoll J, Palomera E, Papiol M, Pous E, Pubill M, Puig J, Puig-Domingo M (Project co-director), Sanahuja J, Serra P, Serra-Prat M (Project co-director), Serrano C, Vilardebò A, Villarroya I.

tal and mood conditions may be due, at least in part, to changes of different magnitudes of the endocrine function.

During ageing, a decrease in the activity of several hormonal systems occurs, which may influence notably the aforementioned changes, such as decline in growth hormone (GH) –somatopause–, loss of gonadal function dealing to a decrease in estrogen and testosterone –menopause and andropause, respectively– and decreased adrenocortical function with a reduced production of dehydroepiandrosterone (DHEA) –adrenopause–. The gradual decline in GH and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is associated to worsening in ageing and increased mortality.^{9,10} In humans, GH/IGF-I secretion decline with ageing. However, data on IGF-I system in relation to longevity are still controversial. Indeed, several reports have shown a protective role of relative low IGF-I levels.^{11,12} Observational studies have suggested that serum testosterone age-related in men is associated with abdominal obesity, metabolic syndrome (MS),¹³ cardiovascular risk factors, type 2 diabetes, dyslipidemia and increased risk of death.¹⁴ In the same way, the progressive reduction in DHEA in physiological ageing, which is not paralleled by a decrease in circulating cortisol, determines a greater action of cortisol by means of an increased cortisol/DHEA ratio, and this appears to have a deleterious effect on cognitive function,¹⁵ and also in concordance, low DHEAS has been associated to cardiovascular mortality. Conversely, high within normal range DHEAS levels have been related to a significant lower mortality for cardiovascular disease in men.¹⁶

The Mataró Ageing Study is a population-based study organized in a Mediterranean country cohort, designed to identify risk factors for decline in functional capacity and mortality in independently living population of 70 years or over.² In the present report, we aimed to describe metabolic and hormonal factors related to survival over an 8 year follow-up period in the cohort of the Mataró Ageing Study.

Subjects and methods

Subjects

Individuals of both genders, aged more than 70 years, living in the neighbourhood of Cirera-Molins in Mataró and the nearby village of Argentona, north of Barcelona, were invited to participate in this longitudinal study aiming to identify factors influencing a frail or robust condition whilst ageing. Institutionalized persons were excluded from the study. The recruitment phase was performed between May 2002 to June 2003, and participants were re-evaluated in 2005 and 2010. The initial cohort included 313 individuals (160 women and 153 men; mean age was 76.7 ± 7 years for the total group, with no differences between sexes) and was evaluated at the beginning of the study in 2002 and after a follow-up of 8 years. The general characteristics of the participants have been described elsewhere.² Last available information was obtained for survival/mortality assessment in 2010 and a follow-up visit was performed in most of survivors. The institutional Ethics committee approved the study protocol and all participants signed an informed consent before entering the study.

Data collection

A comprehensive geriatric assessment was performed by a specialized team composed of 10 general practitioners, specifically trained in evaluating aged people. This assessment was carried out in two Primary Health Care centers having specific facilities for this purpose. It comprised an extensive physical examination and questionnaires to evaluate cognitive, nutritional, depression status and functional capacity as per the study protocol. According to the study protocol, a review of the electronic medical history of the individual and/or a first time evaluation in case of no previous registration at the Consorci Sanitari of Maresme medical history database was done at the start of the study. Chronic and previous diseases, life style factors, education categories and physical examination data were recorded. Blood samples were collected, biochemical and hormonal determinations were performed and results recorded in a database.

The physical examination included weight (in kg) and height (in cm) measures with subjects wearing light clothes; waist circumference was measured in standing position in a line between the last rib and the iliac crest. Body mass index (BMI) was calculated as weight divided by height (meters) squared. Blood pressure was measured twice with the subject being seated after 5 min rest and the mean of two reading was used in the analyses.

Functional capacity was evaluated by determining Barthel score¹⁷ and considered optimal when score = 100. The Spanish version of the MiniMental State Examination (MiniCognoscitive Examination Spanish version –MCE–) was used to assess cognitive function; subjects with ≥ 24 points were considered as having no deterioration of the cognitive function.¹⁸ Depressive status was evaluated performing the Spanish version of the Geriatric Depression Scale (GDS).¹⁹

Eight years after recruitment, the final follow-up control was scheduled for a new physical examination and administration of the same questionnaires for nutritional and functional evaluation. All subjects in the study were contacted by telephone from their Primary care centre and information about death was obtained from the electronic Primary care database, by the telephone contact or reviewing the list of deceases facilitated by the local funerary services.

Hormonal measurements

Blood samples were drawn in the morning after overnight fasting. Hormonal measurements were performed by commercial validated kits with low CVs, and included: free testosterone (men: 0.31–1.42 nM; women: 0.007–0.11 nM; Immunotech, Marseille Cedex, France), estrone (men: 110.97–332.91 pM; women: 73.98–147.96 pM; direct radioimmunoassay (RIA), DSL, Webster, TX, USA); dehydroepiandrosterone (DHEA; men: 0.05–0.3 nM; women: 0.02–0.07 nM; Immunotech) and DHEA sulphate (DHEAS; men: 1.35–15.18 μ M; women: 0.95–11.65 μ M; Immunotech), IGF-I (men 49–250 μ g/l; women: 49–250 μ g/l; Nichols Institute, San Clemente, CA, USA); estradiol (pM), LH (men: 2.0–12.0 mUI/ml; women: 10.0–62.0 mUI/ml) and FSH (men:

2.0–12.0 mUI/ml; women: 5.0–60.0 mUI/ml) (Advia Centaur; Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA), cortisol (138–690 nM) and GH (0.1–5 µg/l; Immulite 2000; Dipsa, Madrid, Spain). Total plasma ghrelin concentrations were measured with a human RIA kit (Linco Research Inc, St Charles, MO, USA). The detection limit was 93 pg/ml with intra- and inter-assay variation coefficients of 11.1% and 14.7%, respectively. All blood samples were taken from 8 to 9 in the morning after a 10-h fasting period. Hormone levels were categorized in quartiles.

Metabolic syndrome (MS) definition. The International Diabetes Federation (IDF) definition of MS²⁰ was used, in which individuals were classified as having MS if the waist perimeter was >94 cm in men or >80 cm in women plus two or more of the following: (i) arterial blood pressure >130/85 mmHg or antihypertensive treatment, (ii) triglycerides >150 mg/dl or use of treatment for hypertriglyceridemia, (iii) high density lipoprotein (HDL) ≤40 mg/dl in men or ≤50 mg/dl in women, or (iv) fasting glucose ≥100 mg/dl or diabetes. We also used the Adult Treatment Panel III (ATP III) definition of MS.²¹ Individuals were classified as having MS if the waist circumference was >102 cm in men or >88 cm in women (central obesity) plus 2 or more of the following: (i) arterial blood pressure >130/85 mmHg or antihypertensive treatment, (ii) triglycerides >150 mg/dl or hypertriglyceridemia treatment, (iii) HDL ≤40 mg/dl in men or ≤50 mg/dl in women, or (iv) fasting glucose ≥100 mg/dl or diabetes [glucose impairment (GI)].

Data analysis

Categorical variables were expressed as percentages, and continuous data as mean (standard deviation). Kolmogorov–Smirnov test was used to assess normality of continuous variables. Categorical variables were studied using Chi-Square test. To compare means *t*-Student test, U-Mann Whitney or ANOVA were used as suitable. We used Kaplan–Meier survival curves to plot time to event by waist circumference quartile category and the unadjusted log-rank test to compare survival curves. Kaplan–Meier survival curves were used to study the influence of hormonal profiles in mortality. Univariate and multivariate Cox proportional hazard models were constructed including as covariates known CVD risk factors as well as factors shown to be associated in the univariate analysis. We considered statistical significance for association when the *P* value was <0.05.

The theoretical sample size was calculated accepting an alpha risk of 0.05 and a beta risk of 0.2 in a two-sided test, where 56 subjects were necessary in first group (GH <20th percentile) and 280 in the second (GH >20th percentile) to find as statistically significant a difference in mortality at 8 years of follow up, expected to be of 50% in group 1 and 30% in group 2.

Results

Three hundred and thirteen independently living subjects were initially recruited, 160 women with a mean age of 77.3 (6.4) years and 153 men with a mean age of 76.7 (5.4) years.

Among those initially recruited, 96 subjects (30.7% of the initial sample) died during the follow-up period, and 65 (20.8%) being firmly confirmed to be alive did not wish to have the last visit geriatric and functional assessments, so physical examination, and nutritional and functional questionnaires were not available for them at the end of the study. As alive condition was ascertained in those 65 subjects, they were not considered as lost of follow up when mortality was analyzed in relation to basal hormonal and metabolic factors and phenotype.

Table 1 shows baseline metabolic, nutritional and functional characteristics of individuals according to survival category. Individuals surviving at 8 years of follow-up were significantly younger ($P < 0.001$), performed better in functional ($P = 0.002$) and cognitive capacity ($P = 0.002$), and presented better nutritional status ($P = 0.004$) at baseline examination.

In relation to abdominal perimeter and MS, no association was found between baseline MS parameters and survival; however, a trend towards significance ($P = 0.064$) was observed in relation to increased waist circumference by IDF, by which individuals with higher waist circumference had a higher survival at 8 years follow-up [pathological waist circumference (WC) in deceased vs non-deceased: 89.6% vs 94.6%; see Table 2]. When abdominal perimeter was analyzed according to distribution in quartiles and categorized by gender, those in the lowest and highest quartile showed higher mortality in a U-shaped relationship (31.1% in men with WC ≤98 cm or women ≤95 cm, 19.8% in men with WC 98–102 cm or women 95–102 cm, 40.3% in men with WC 102–107 cm or women with 102–108 cm and 42.3% in men with WC >107 cm or women with >108 cm; $P = 0.009$) (Fig. 1). No association with mortality was found when neither IDF nor ATP-III central obesity cut-off criteria were used ($P = ns$).

Table 3 shows the relationship between hormonal parameters and survival. In men, IGF-I ($P = 0.003$), estrone ($P = 0.053$), cortisol/DHEA ratio ($P = 0.052$) and cortisol/DHEAs ratio ($P = 0.037$) were lower in survivors, and in women, GH ($P = 0.063$) and ghrelin ($P = 0.043$) were higher in survivors and lower cortisol/DHEA ratio ($P = 0.073$) showed a trend to significance. When Cox regression was performed for survival analysis of the whole cohort (adjusting by age, gender, tobacco consumption, WC and Barthel), cortisol ($B = 0.035$, $P = 0.043$, RR: 1.036, CI: 1.001–1.072), estrone ($B = 0.014$, $P = 0.005$; RR: 1.014, CI: 1.004–1.024) and cortisol/DHEA ratio ($B = 0.014$, $P = 0.040$; RR 1.014, CI: 1.001–1.028) were significantly associated to mortality. When considering only men, Cox regression analysis showed a significant association of estrone ($B = 0.011$, $P = 0.047$; RR: 1.011, CI: 1–1.023) with mortality. In women, a trend to significant association with mortality was found for cortisol ($B = 0.046$, $P = 0.082$; RR: 1.047, CI: 0.994–1.103) and cortisol/DHEA ratio ($B = 0.017$, $P = 0.056$; RR: 1.017, CI: 1–1.034). Sequential adjustments including additionally in the model Lawton scale, MiniNutritional Assessment (MNA) and MCE are depicted in Table 3.

Table 4 shows baseline hormonal characteristics divided into quartiles categorized to survival at 8-year follow-up. When the

Table 1. Baseline metabolic, nutritional and functional characteristics of individuals depending on their survival at 8 year follow-up

	Total (n = 313)			Men (n = 153)			Women (n = 160)		
	Survivors (n = 217)	Deceased (n = 96)	P	Survivors (n = 99)	Deceased (n = 54)	P	Survivors (n = 116)	Deceased (n = 44)	P
Age	75.46 (4.87)	80.15 (6.76)	<0.001	75.22 (4.13)	79.26 (6.40)	<0.001	75.69 (5.46)	81.28 (7.11)	<0.001
Weight (kg)	69.85 (10.77)	70.91 (12.99)	0.458	73.57 (9.90)	73.28 (12.44)	0.883	66.48 (10.44)	67.86 (13.19)	0.501
WC (cm)	100.78 (11.21)	103.60 (11.14)	0.043	101.32 (11.37)	102.50 (11.61)	0.547	100.29 (11.08)	105.02 (10.46)	0.019
BMI (kg/m ²)	27.99 (3.85)	28.25 (4.65)	0.643	27.15 (3.40)	27.14 (4.15)	0.988	28.76 (4.08)	29.67 (4.92)	0.249
Barthel	97.39 (4.03)	93.30 (12.39)	0.002	98.49 (3.19)	95.38 (8.70)	0.015	96.39 (4.43)	90.61 (15.66)	0.025
Lawton	6.74 (1.61)	5.12 (2.48)	0.002	6.12 (1.56)	4.29 (2.26)	<0.001	7.30 (1.45)	6.14 (2.39)	0.005
GDS	1.18 (1.18)	1.36 (1.25)	0.223	0.77 (0.90)	1.10 (1.14)	0.063	1.54 (1.28)	1.69 (1.32)	0.521
MCE	29.83 (4.90)	27.26 (6.54)	0.002	30.99 (3.98)	28.38 (5.84)	0.006	28.85 (5.38)	25.66 (7.27)	0.021
MNA	13.97 (1.54)	13.22 (2.15)	0.004	14.33 (1.27)	13.70 (1.46)	0.014	13.63 (1.69)	12.68 (2.64)	0.012
Creatinine (μM)	84.86 (18.56)	90.17 (22.98)	0.051	92.82 (21.22)	99.01 (24.75)	0.108	77.79 (12.38)	78.68 (13.26)	0.862
Total cholesterol (mM)	5.42 (0.90)	5.52 (1.12)	0.422	5.26 (0.89)	5.31 (1.10)	0.788	5.55 (0.89)	5.79 (1.09)	0.183
LDL (mM)	3.33 (2.18)	3.38 (0.93)	0.658	3.27 (0.84)	3.28 (0.97)	0.930	3.38 (0.85)	3.50 (0.87)	0.452
HDL (mM)	1.43 (0.33)	1.39 (0.34)	0.422	1.32 (0.26)	1.30 (0.31)	0.812	1.52 (0.35)	51.51 (0.35)	0.816
Tryglycerides (mM)	1.39 (0.78)	1.84 (1.16)	0.053	1.40 (0.65)	1.82 (1.61)	0.405	1.37 (0.70)	1.63 (70.81)	0.071
Albumin (g/l)	41.90 (2.69)	40.89 (3.14)	0.006	42.38 (2.46)	41.01 (3.01)	0.007	41.49 (2.82)	40.62 (3.33)	0.123
Haemoglobin (mM)	8.53 (1.53)	8.25 (2.05)	0.187	8.99 (1.80)	8.48 (2.00)	0.115	8.13 (1.10)	7.96 (2.10)	0.628

WC, waist circumference; BMI, body mass index; GDS, Geriatric Depression Scale; MCE, MiniCognitive Examination; MNA, MiniNutritional Assessment; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein.

Table 2. Survival in relation to metabolic syndrome criteria

	N in exitus/N in no-exitus	% in exitus/% in no-exitus	P (KM)
Pathological WC by IDF	86/191	89.6/94.6	0.064
Pathological WC by ATP-III	66/136	68.8/67.3	0.947
Pathological tryglycerides	27/45	31.8/22.4	0.133
Pathological HDL	18/41	21.2/20.4	0.846
Hypertension	81/179	85.3/88.6	0.520
Glucose impairment	43/104	50/51.7	0.637
MS by IDF	46/116	54.1/59.2	0.436
MS by ATP-III	42/97	50/49.7	0.980

N, number; WC, waist circumference; HDL, high density lipoprotein; MS, metabolic syndrome; KM, Kaplan Meyer analysis; IDF, International Diabetes Federation.

total sample was analyzed, we found significant associations with TSH (P lineal trend = 0.049), GH (P = 0.010), estrone (P lineal trend = 0.034), and a trend to an association with cortisol (P = 0.069) and DHEA (P = 0.083). In men, higher GH levels (P = 0.015) were associated to higher mortality, while in women, higher GH levels (P = 0.015) was associated to lower mortality. Men presented higher mortality when higher cortisol/DHEA (P = 0.056) and cortisol/DHEAs (P lineal trend = 0.046) ratios were present; however, in women, while lower DHEA was associated to higher mortality (P = 0.007), no significant association was found with cortisol/DHEA ratio. The analyses including sequential adjustment by Lawton scale, MNA and MCE are shown in Table 4.

Discussion

This study provides a thorough description of nutritional, metabolic and hormonal factors related to mortality in non-institutionalized people older than 70 years participating in the Mataró Ageing Study. In relation to metabolic parameters, a unique U-shaped relationship between mortality and waist circumference was found. When considering MS according to its classic definition used for younger adults, no association was observed with its different components and mortality, including waist circumference both by the original IDF and ATP-III criteria. However, when WC was analyzed by quartile distribution, we found this U-shaped association with mortality. The specific cut-off WC value to be considered of relevant pathological value has been highly debated, and little consistent data is readily available to be applied in elders. In our sample, anthropometric measurements indicate that WC between 98–102 cm in men and 95–102 cm in women are respectively associated to lower mortality, suggesting that this particular WC segment with this gender consideration may actually be protective in terms of mortality and that the original IDF and ATP-III criteria are useless in our elder population. The same applies for MS definition, a condition that probably requires at age >75 years, either a redefinition or just its elimination from the clinical use in gerontology. In this regard, different studies have also shown this U-shaped relationship between WC and mortality²² while other studies have shown a lineal association.²³ However, all these studies were generally performed in individuals with a wide range of age and not including only subjects older than 75 years, which strongly limits the predictive value for old people, as they are not

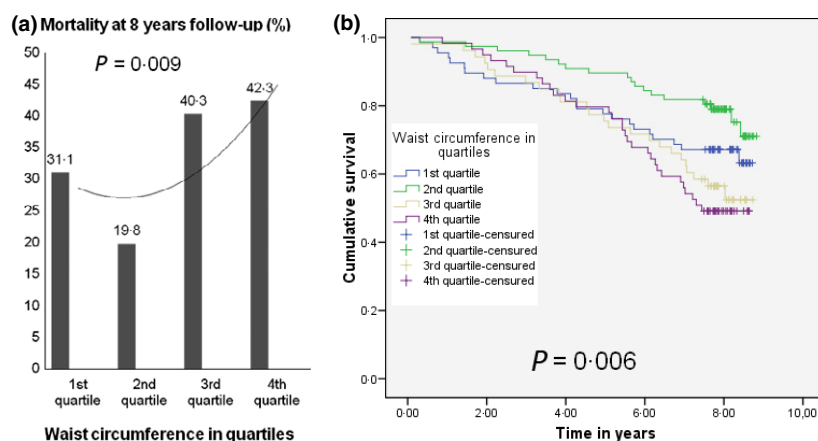


Fig. 1 Mortality at 8 years follow-up in relation to waist circumference divided into quartiles (a) and estimated survival (Kaplan-Meier) by waist circumference divided into quartiles (b). 1st quartile: ≤ 98 cm in men or ≤ 95 cm in women; 2nd quartile: 98–102 cm in men or 95–102 cm in women; 3rd quartile: 102–107 cm in men or 102–108 cm in women; 4th quartile: >107 cm in men or >108 cm in women.

sufficiently represented. Other anthropometric measurements, such as hip, waist-to-hip ratio have also been used in order to improve risk prediction models,²⁴ but our data did not indicate an association between mortality and these measurements (data not shown). Additionally, although recent studies have demonstrated the importance of maintaining a healthy WC and BMI for young individuals living with diabetes,²⁵ once again, we did not observe any association between WC and mortality in our diabetic population, although these negative results may have been influenced by our sample size and/or by survival bias.

Studies aiming to evaluate the characteristics of individuals surviving at ages >100 years show that they use to escape from cardiovascular diseases or delay them at a point that MS in its classic concept does not identify a risk condition.^{26,27}

Mortality in our cohort was related to gonadal and adrenal steroids, as well as to the somatotrophic axes activity. In relation to gonadal hormones, estrone was associated to higher mortality in the whole sample (higher estrone levels, higher mortality). A recent study²⁸ has observed that lower estrone levels are associated with poorer self-rated health in older men; however no data in relation to survival is available. On the other hand, in women, no significant association of estrone has yet been described with mortality,²⁹ as it was the case in our woman sample. On the other side, no association of estradiol and testosterone with mortality was found in our cohort. Although low testosterone levels have been strongly associated to abdominal obesity,³⁰ cardiovascular risk factors and MS,³¹ type 2 diabetes,³² dyslipidemia and increased inflammatory markers, regarding mortality, only controversial results have been reported, with a low degree of association with all-cause mortality and even less with cardiovascular mortality.¹⁴

Considering adrenal axis, a trend to significance was observed with cortisol (lineal association), DHEA (U-shaped), and cortisol/DHEA but no association with DHEAs or cortisol/DHEAs ratios for the whole cohort was found. In men, mortality showed a trend to association with cortisol, cortisol/DHEA and association with cortisol/DHEAs ratio, while in women,

mortality was associated to DHEA and cortisol/DHEA ratio. A previous study of our group observed a significant relationship between DHEA and testosterone with frailty development in men, but not in women.³³ DHEA and DHEAs concentrations and its association to mortality in old people is a matter of substantial controversy. In the Swedish Men study,¹⁶ and in another study,³⁴ both low DHEA and DHEAs predicted increased mortality only below 75 years of age but not above, while other two cohort studies have shown an association between low DHEAs and increased mortality in old men,^{8,35} and finally, other six prospective studies indicate an association between lower DHEAs levels and atherosclerotic disease progression both in men and women,^{36,37} but without demonstrating an association with mortality in women^{35,38,39} and men.^{34,40} Possible mechanistic explanations for such an association may be related to DHEA and DHEAs biologic effects, as i.e. the stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α pathway, among others, which modulates immune function, and protects from oxidative stress and atherosclerosis development.⁴¹ We did not find an association between DHEAs and mortality but, in our sample, higher cortisol/DHEAs ratio was associated to higher mortality. A recent study⁴² searching for association with all-cause mortality risk in elderly men from the community, found no consistent association with sex steroid and gonadotrophin measurements.

In our cohort a significant association between mortality and low levels of GH and ghrelin was found, the latter only observed in women. The somatotrophic axis and its activity has been implicated in both healthy and non-healthy aging, by virtue of which an improved or impaired IGF-I action may influence the development of diseases affecting longevity and survival with a U-shape relationship.⁹ Low IGF-I has been causally linked to frailty in old individuals with different degrees of disability and premature mortality.¹⁰ IGF-I levels can confidently reflect GH secretion in young well nourished subjects, while in old individuals IGF-I concentrations may be modulated by other non-GH related factors, i.e. the nutritional state, obesity, sex steroid levels and insulin action. Previous data of our group have shown a

Table 3. Baseline hormonal characteristics of individuals depending on their survival at 8 year follow-up

	Total (n = 313)				Men (n = 153)				Women (n = 160)			
	Survivors (n = 217)	Deceased (n = 96)	P	RR (CI _{95%}); P*	Survivors (n = 99)	Deceased (n = 54)	P	RR (CI _{95%}); P*	Survivors (n = 116)	Deceased (n = 44)	P	RR (CI _{95%}); P*
TSH (mIU/l)	2.24 (3.45)	2.16 (1.85)	0.841	-	1.84 (1.21)	2.17 (1.99)	0.293	-	2.59 (4.56)	2.15 (1.67)	0.565	-
Free-T4 (pmol/l)	12.94 (2.36)	13.08 (2.75)	0.663	-	13.35 (2.34)	13.01 (2.80)	0.441	-	12.57 (2.32)	13.17 (2.70)	0.190	-
Growth hormone (µg/l)	1.65 (2.42)	1.36 (1.86)	0.269	-	0.79 (1.79)	1.05 (1.35)	0.378	-	2.39 (2.64)	1.75 (2.31)	0.063	-
IGF-I (µg/l)	107.44 (34.57)	109.05 (40.43)	0.732	-	114.32 (36.49)	119.15 (42.05)	0.003	-	101.51 (31.82)	96.29 (34.77)	0.397	-
Ghrelin (pg/ml)	1095.78 (415.57)	1028.35 (368.33)	0.195	-	1148.32 (418.99)	1129.75 (383.75)	0.798	-	1048.74 (408.76)	900.26 (307.26)	0.043	-
Cortisol (nmol/l)	500.58 (194.13)	518.43 (175.94)	0.464	1.027 (0.988-1.068), 0.174‡	465.62 (178.60)	507.38 (17.087)	0.164	1.036 (1.001-1.072), 0.043†	532.40 (202.01)	532.39 (183.49)	1	1.047 (0.994-1.103), 0.082†
DHEAs (µmol/l)	1.32 (1.15)	1.20 (0.94)	0.401	1.030 (0.995-1.067), 0.096§	1.76 (1.40)	1.37 (0.94)	0.086	1.029 (0.988-1.071), 0.166¶	0.94 (0.67)	0.99 (0.89)	0.735	1.048 (0.997-1.103), 0.068§
DHEA (nmol/l)	0.05 (0.03)	0.04 (0.03)	0.056	1.029 (0.988-1.071), 0.166¶	0.05 (0.03)	0.04 (0.03)	0.321	1.029 (0.988-1.071), 0.166¶	0.05 (0.02)	0.05 (0.04)	0.928	1.045 (0.982-1.113), 0.165¶
Testosterone (nmol/l)	0.21 (0.22)	0.27 (0.24)	0.244	-	0.43 (0.13)	0.42 (0.20)	0.727	-	0.03 (0.02)	0.04 (0.03)	0.389	1.260 (0.948-1.674), 0.111†
SHBG (nmol/l)	39.93 (20.56)	41.11 (25.27)	0.679	-	34.64 (13.84)	39.90 (24.45)	0.172	-	44.49 (24.09)	42.65 (26.53)	0.693	1.426 (1.031-1.116), 0.032‡
Estradiol (pmol/l)	143.57 (58.46)	158.54 (60.99)	0.071	-	175.20 (48.77)	186.54 (59.82)	0.229	-	116.60 (52.33)	123.13 (41.21)	0.486	1.312 (0.904-1.748), 0.064§
Estrone (pmol/l)	122.18 (62.99)	150.10 (90.96)	0.017	1.014 (1.004-1.024), 0.005†	148.81 (61.77)	179.73 (99.06)	0.053	1.011 (1.000-1.023), 0.047†	99.24 (54.67)	112.67 (62.96)	0.213	1.025 (1.001-1.050), 0.042¶
Cortisol/DHEAs	613.89 (448.93)	652.84 (440.71)	0.499	1.017 (1.006-1.028), 0.017‡	417.19 (298.64)	549.76 (394.51)	0.037	1.009 (0.997-1.021), 0.141§	783.26 (487.28)	783.04 (466.14)	0.998	1.450 (1.044-2.013), 0.027¶
Cortisol/DHEA	13512.78 (9377.70)	18565.57 (17545.82)	0.020	1.018 (1.008-1.029), 0.018¶	14159.65 (11202.61)	18061.14 (15058.05)	0.052	1.017 (1.004-1.030), 0.010¶	12955.75 (7469.55)	19202.74 (20456.35)	0.073	1.017 (1.000-1.034), 0.056†
				1.010 (0.995-1.026), 0.181‡								1.014 (0.995-1.034), 0.143‡
				1.018 (1.004-1.033), 0.181§								1.023 (1.006-1.041), 0.010§
				1.015 (0.998-1.032), 0.093¶								1.020 (1.002-1.039), 0.032¶

IGF-I, insulin growth factor I; IGF-BP3, IGF binding protein 3; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEAs, DHEA sulphate; SHBG, sexual hormone binding protein; MCE, MiniCognitive Examination; MNA, MiniNutritional Assessment; WC, waist circumference.

*Adjusted by Cox regression.

†Model 1: Adjusted by age, gender, tobacco consumption, WC and Barthel.

‡Model 2: Adjusted by age, gender, tobacco consumption, WC, Barthel, MNA and MCE.

§Model 3: Adjusted by age, gender, tobacco consumption, WC and Lawton.

¶Model 4: Adjusted by age, gender, tobacco consumption, WC, Lawton, MNA and MCE.

Table 4. Baseline hormonal characteristics divided into quartiles depending on their survival at 8 year follow-up

		Total			Homes			Dones		
		N exitus (%)	P	Adjusted P	N exitus (%)	P	Adjusted P	N exitus	P	Adjusted P
TSH (mUI/l)	Low	5 (19.2)	0.089*	0.254‡	3 (23.1)	0.139*		2 (15.4)	0.379*	
	Normal	70 (29.3)	0.049†		39 (32.8)	0.126†		31 (25.8)	0.172†	
GH (µg/l)	High	11 (47.8)			6 (60)			5 (38.5)		
	≤0.2	25 (27.8)	0.016*	0.010‡	17 (23.3)	0.007*	0.015‡	8 (47.1)	0.054*	0.015‡
	≤0.7	15 (26.8)	0.838†	0.045§	10 (35.7)	0.007†	0.690§	5 (17.9)	0.054†	0.018§
	≤2.05	30 (42.9)		0.006¶	15 (62.5)		0.071¶	15 (32.6)		0.007¶
IGF-I (µg/l)	>2.05	16 (22.5)		0.034	6 (37.5)		0.371	10 (18.2)		0.011
	≤83	21 (28.8)	0.256*	0.083‡	10 (32.3)	0.343*		11 (26.2)	0.962*	
	≤104.5	22 (31.4)	0.285†	0.012§	10 (35.7)	0.489†		12 (28.6)	0.771†	
	≤128	16 (21.6)		0.246¶	8 (22.2)			8 (21.1)		
Testosterone (nmol/l)	>128	27 (38.6)		0.009	20 (43.5)			7 (29.2)		
	M≤0.32 – W≤0.009	20 (27.0)	0.174*		16 (43.2)	0.196*		11 (27.5)	0.556*	
	M≤0.40 – W≤0.028	15 (26.8)	0.897†		9 (27.3)	0.711†		8 (22.9)	0.551†	
	M≤0.52 – W≤0.05	30 (42.9)			10 (27.8)			8 (21.6)		
SHBG (nmol/l)	M>0.52 – W>0.05	24 (32.4)			13 (37.1)			11 (31.4)		
	M≤23.6 – W≤26.7	21 (30.0)	0.729*		11 (31.4)	0.478*		10 (28.6)	0.821*	
	M≤34.4 – W≤38.5	25 (33.8)	0.870†		14 (38.9)	0.690†		11 (28.9)	0.442†	
	M≤47.1 – W≤54.35	19 (26.8)			9 (25.7)			10 (27.8)		
Estrone (pmol/l)	M>47.1 – W>54.35	21 (29.2)			14 (40.0)			7 (18.9)		
	M≤111 – W≤70.3	18 (24.0)	0.178*	0.456‡	10 (26.3)	0.808*	0.367*	8 (21.6)	0.250*	
	M≤144 – W≤142	35 (28.2)	0.034†	0.162§	12 (33.3)			23 (26.1)	0.177†	
	M≤189 – W≤92	10 (31.3)		0.839¶	10 (31.3)			0 (0)		
Estradiol (pmol/l)	M>189 – W>92	23 (41.1)		0.185	16 (33.3)			7 (33.3)		
	M≤143 – W≤92	17 (23.6)	0.514*		10 (28.6)	0.732*	0.814*	7 (18.9)	0.664*	0.114‡
	M≤176 – W≤117	26 (34.7)	0.568†		14 (38.9)			12 (30.8)	0.535†	0.029§
	M≤213 – W≤147	17 (24.3)			10 (28.6)			7 (20.0)		0.145¶
Cortisol (nmol/l)	M>213 – W>147	26 (36.6)			14 (40.0)			12 (33.3)		0.042
	≤383.64	19 (26.0)	0.627*	0.069‡	11 (26.8)	0.271*		8 (25.0)	0.948*	
	≤487.14	19 (26.8)	0.232†	0.302§	10 (26.3)	0.070†		9 (27.3)	0.903†	
	≤618.24	25 (33.8)		0.061¶	14 (41.2)			11 (27.5)		
DHEAS (µmol/l)	>618.24	23 (33.3)		0.271	13 (46.4)			10 (24.0)		
	M≤0.65 – W≤0.41	30 (29.7)	0.459*		15 (41.7)	0.830.		15 (23.1)	0.203*	
	M≤1.36 – W≤0.76	16 (36.4)	0.617†		12 (34.3)	0.369†		4 (44.4)	0.971†	
	M≤2.17 – W≤1.30	24 (33.3)			12 (33.3)			12 (33.3)		
DHEA (nmol/l)	M>2.17 – W>1.30	16 (22.9)			9 (26.5)			7 (19.4)		
	M≤0.031 – W≤0.035	29 (39.2)	0.303*	0.083‡	13 (37.1)	0.800*		16 (41.0)	0.057*	0.007‡
	M≤0.052 – W≤0.055	23 (29.1)	0.341†	0.017§	17 (40.5)	0.861†		6 (16.2)	0.286†	0.017§
	M≤0.069 – W≤0.087	16 (23.2)		0.391¶	9 (27.3)			7 (19.4)		0.012¶
Cortisol/DHEAS	M>0.069 – W>0.087	18 (27.7)		0.251	9 (29.0)			9 (26.5)		0.030
	M≤201.18 – W>418.71	16 (22.9)	0.496*		7 (20.6)	0.413*		9 (25.0)	0.962*	
	M≤353.46 – W≤648.28	21 (29.2)	0.132†		12 (33.3)	0.046†		9 (25.0)	0.788†	
	M≤635.51 – W≤1032.03	25 (33.8)			14 (38.9)			11 (28.9)		
Cortisol/DHEA	M>635.51 – W>1032.03	24 (33.8)			15 (42.9)			9 (25.0)		
	M≤8002.11 – W≤7453.20	19 (26.8)	0.264*		8 (22.2)	0.083*	0.056‡	11 (31.4)	0.120*	0.073‡
	M≤12403.57 – W≤10911.97	17 (24.3)	0.174†		13 (38.2)	0.218†	0.100§	4 (11.1)	0.609†	0.040§
	M≤18332.10 – W≤18332.10	21 (27.6)			9 (25.0)		0.190¶	12 (30.0)		0.027¶
	M>18332.10 – W>18332.10	21 (27.6)			18 (51.4)		0.167	11 (31.4)		0.023

M: men; W: women.

*KM survival analysis.

†KM trend survival analysis.

‡Model 1: Adjusted by age, gender, tobacco consumption, WC and Barthel.

§Model 2: Adjusted by age, gender, tobacco consumption, WC, Barthel, MNA and MCE.

¶Model 3: Adjusted by age, gender, tobacco consumption, WC and Lawton.

||Model 4: Adjusted by age, gender, tobacco consumption, WC, Lawton, MNA and MCE.

potentially important role of ghrelin in frailty development in elders.^{43,44} As far as we know, this is the first report describing an association between mortality and ghrelin in women.

The sequential adjustments performed in the analyses, including Barthel, Lawton, MCE and MNA certainly stressed the statistical power of the sample, as more confounders are added in the analysis, more dilution of the associations is observed. Some of the relationship observed in the univariate analysis or with models including all confounders loosed their significance, while other was maintained. Including MNA and MCE scores are relevant as they are confirmedly related with mortality; however, as they are also strongly influenced by hormonal factors, their inclusion as confounders may certainly dilute the statistical significance of the observed associations and even may incur in some kind of colinearity. Additionally, although Lawton score was included in the analysis it is worth recalling that in the men of this particular cohort it may not be particularly informative of the true degree of instrumental abilities and thus reliable, due to the fact that these men had never acquired some instrumental roles in their social life due to cultural reasons.

The strengths of our study are that the cohort investigated is a homogeneous sample obtained from a specific geographical area with a common cultural background that warrants a similar lifestyle; moreover, the phenotypic characterization of the subjects is quite extensive. However, our study has also several limitations; first, although it is a population-based study where non-institutionalized individuals were selected, the final number of included subjects was certainly limited to the recruitment possibilities in the specific geographical area in which the study was performed; a superior number of participants together with a longer follow-up would have allowed a stronger statistical power. Also, in our subject's sample, a high prevalence of MS and central obesity according to ATP-III criteria were found, which may have contributed to a bias.

In conclusion, our results demonstrate that WC in a U-shaped relationship, together with different hormonal factors is associated to survival in individuals participating in Mataró Ageing Study.

Acknowledgements

Special thanks to Nicola Van Berckel for her English version of the manuscript.

Author contributions

M. Mora analyzed data, wrote paper and had primary responsibility for final content. E. Palomera designed and conducted research. M. Serra-Prat designed and conducted research. M. Puig-Domingo designed and conducted research, wrote paper and had primary responsibility for final content.

Funding

This work was supported by Fondo Investigaciones Sanitarias Grant 07/0601.

Declaration of interest

The authors have nothing to declare in relation to this article.

References

- 1 Barbieri, M., Gambardella, A., Paolisso, G. *et al.* (2008) Metabolic aspects of the extreme longevity. *Experimental Gerontology*, **43**, 74–78.
- 2 Puig-Domingo, M., Serra-Prat, M., Merino, M.J. *et al.* (2008) Muscle strength in the Mataro aging study participants and its relationship to successful aging. *Aging Clinical and Experimental Research*, **20**, 439–446.
- 3 Tas, U., Steyerberg, E.W., Bierma-Zeinstra, S.M. *et al.* (2011) Age, gender and disability predict future disability in older people: the Rotterdam Study. *BMC Geriatrics*, **22**, DOI:10.1186/1471-2318-11-22 Epub 2011 May 10.
- 4 Nosraty, L., Sarkeala, T., Hervonen, A. *et al.* (2012) Is there successful aging for nonagenarians? The vitality 90+ study. *Journal of Aging Research*, DOI:10.1155/2012/868797 Epub 2012 Oct 16.
- 5 Gentilini, D., Mari, D., Castaldi, D. *et al.* (2013) Role of epigenetics in human aging and longevity: genome-wide DNA methylation profile in centenarians and centenarians' offspring. *Age (Dordrecht)*, **35**, 1961–1973.
- 6 Lamberts, S.W., van den Beld, A.W. & van der Lely, A.J. (1997) The endocrinology of aging. *Science*, **278**, 419–424.
- 7 Janssen, J.A., Stolk, R.P., Pols, H.A. *et al.* (1998) Serum free and total insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 Levels in healthy elderly individuals. Relation to self-reported quality of health and disability. *Gerontology*, **44**, 277–280.
- 8 Maggio, M., Lauretani, F., Ceda, G.P. *et al.* (2007) Relationship between low levels of anabolic hormones and 6-year mortality in older men: the aging in the Chianti Area (InCHIANTI) study. *Archives of Internal Medicine*, **167**, 2249–2254.
- 9 Brugts, M.P., van den Beld, A.W., Hofland, L.J. *et al.* (2008) Low circulating insulin-like growth factor I bioactivity in elderly men is associated with increased mortality. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **93**, 2515–2522.
- 10 Cappola, A.R., Xue, Q.L., Ferrucci, L. *et al.* (2003) Insulin-like growth factor I and interleukin-6 contribute synergistically to disability and mortality in older women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 2019–2025.
- 11 Bonafe, M., Barbieri, M., Marchegiani, F. *et al.* (2003) Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 3299–3304.
- 12 Vitale, G., Brugts, M.P., Ogliaeri, G. *et al.* (2012) Low circulating IGF-I bioactivity is associated with human longevity: findings in centenarians' offspring. *Aging (Albany NY)*, **4**, 580–589.
- 13 Kupelian, V., Page, S.T., Araujo, A.B. *et al.* (2006) Low sex hormone-binding globulin, total testosterone, and symptomatic androgen deficiency are associated with development of the metabolic syndrome in nonobese men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **91**, 843–850.
- 14 Araujo, A.B., Dixon, J.M., Suarez, E.A. *et al.* (2011) Clinical review: endogenous testosterone and mortality in men: a system-

- atic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **96**, 3007–3019.
- 15 Ferrari, E., Cravello, L., Muzzoni, B. *et al.* (2001) Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. *European Journal of Endocrinology*, **144**, 319–329.
 - 16 Ohlsson, C., Labrie, F., Barrett-Connor, E. *et al.* (2010) Low serum levels of dehydroepiandrosterone sulfate predict all-cause and cardiovascular mortality in elderly Swedish men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **95**, 4406–4414.
 - 17 Mahoney, F.I. & Barthel, D.W. (1965) Functional evaluation: the Barthel index. *Maryland State Medical Journal*, **14**, 61–65.
 - 18 Lobo, A., Saz, P., Marcos, G. *et al.* (1999) [Revalidation and standardization of the cognition mini-exam (first Spanish version of the Mini-Mental Status Examination) in the general geriatric population]. *Medicina Clínica*, **112**, 767–774.
 - 19 Fernandez-San, M.M., Andrade-Rosa, C., Molina, J.D. *et al.* (2002) Validation of the Spanish version of the geriatric depression scale (GDS) in primary care. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, **17**, 279–287.
 - 20 Alberti, K.G., Zimmet, P. & Shaw, J. (2006) Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*, **23**, 469–480.
 - 21 Anonymous (2001) Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486–2497.
 - 22 Carmienke, S., Freitag, M.H., Pischon, T. *et al.* (2013) General and abdominal obesity parameters and their combination in relation to mortality: a systematic review and meta-regression analysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, **67**, 573–585.
 - 23 Zhang, C., Rexrode, K.M., van Dam, R.M. *et al.* (2008) Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: sixteen years of follow-up in US women. *Circulation*, **117**, 1658–1667.
 - 24 Cameron, A.J., Magliano, D.J. & Soderberg, S. (2013) A systematic review of the impact of including both waist and hip circumference in risk models for cardiovascular diseases, diabetes and mortality. *Obesity Reviews*, **14**, 86–94.
 - 25 Katzmarzyk, P.T., Hu, G., Cefalu, W.T. *et al.* (2013) The importance of waist circumference and BMI for mortality risk in diabetic adults. *Diabetes Care*, **36**, 3128–3130.
 - 26 Evert, J., Lawler, E., Bogan, H. *et al.* (2003) Morbidity profiles of centenarians: survivors, delayers, and escapers. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, **58**, 232–237.
 - 27 Schoenhofen, E.A., Wyszynski, D.F., Andersen, S. *et al.* (2006) Characteristics of 32 supercentenarians. *Journal of American Geriatrics Society*, **54**, 1237–1240.
 - 28 Hsu, B., Cumming, R.G., Blyth, F.M. *et al.* (2014) Longitudinal and cross-sectional relationships of circulating reproductive hormone levels to self-rated health and health-related quality of life in community-dwelling older men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, DOI:10.1210/jc.2014-1124 Epubmed.
 - 29 de Padua, M.A., Silva, T.C., Takada, J.Y. *et al.* (2012) Long-term prospective study of the influence of estrone levels on events in postmenopausal women with or at high risk for coronary artery disease. *The Scientific World Journal*, **2012**, 363595.
 - 30 Derby, C.A., Zilber, S., Brambilla, D. *et al.* (2006) Body mass index, waist circumference and waist to hip ratio and change in sex steroid hormones: the Massachusetts Male Ageing Study. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, **65**, 125–131.
 - 31 Muller, M., Grobbee, D.E., den Tonkelaar, I. *et al.* (2005) Endogenous sex hormones and metabolic syndrome in aging men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 2618–2623.
 - 32 Ding, E.L., Song, Y., Malik, V.S. *et al.* (2006) Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, **295**, 1288–1299.
 - 33 Mora, M., Sanchez, L., Serra-Prat, M. *et al.* (2012) Hormonal determinants and effect of ER22/23EK glucocorticoid receptor gene polymorphism on health status deterioration in the participants of the Mataro Ageing Study. *Age (Dordrecht)*, **34**, 553–561.
 - 34 Kahonen, M.H., Tilvis, R.S., Jolkkonen, J. *et al.* (2000) Predictors and clinical significance of declining plasma dehydroepiandrosterone sulfate in old age. *Ageing (Milano)*, **12**, 308–314.
 - 35 Trivedi, D.P. & Khaw, K.T. (2001) Dehydroepiandrosterone sulfate and mortality in elderly men and women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 4171–4177.
 - 36 Bernini, G.P., Sgro', M., Moretti, A. *et al.* (1999) Endogenous androgens and carotid intimal-medial thickness in women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**, 2008–2012.
 - 37 Herrington, D.M., Gordon, G.B., Achuff, S.C. *et al.* (1990) Plasma dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in patients undergoing diagnostic coronary angiography. *Journal of the American College of Cardiology*, **16**, 862–870.
 - 38 Barrett-Connor, E. & Goodman-Gruen, D. (1995) Dehydroepiandrosterone sulfate does not predict cardiovascular death in postmenopausal women. The Rancho Bernardo Study. *Circulation*, **91**, 1757–1760.
 - 39 Tchernof, A. & Labrie, F. (2004) Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies. *European Journal of Endocrinology*, **151**, 1–14.
 - 40 Legrain, S., Berr, C., Frenoy, N. *et al.* (1995) Dehydroepiandrosterone sulfate in a long-term care aged population. *Gerontology*, **41**, 343–351.
 - 41 Poynter, M.E. & Daynes, R.A. (1998) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 32833–32841.
 - 42 Haring, R., Teng, A., Xanthakis, V. *et al.* (2013) Association of sex steroids, gonadotrophins, and their trajectories with clinical cardiovascular disease and all-cause mortality in elderly men from the Framingham Heart Study. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, **78**, 629–634.
 - 43 Serra-Prat, M., Fernandez, X., Burdoy, E. *et al.* (2007) The role of ghrelin in the energy homeostasis of elderly people: a population-based study. *Journal of Endocrinological Investigation*, **30**, 484–490.
 - 44 Serra-Prat, M., Palomera, E., Roca, M. *et al.* (2010) Long-term effect of ghrelin on nutritional status and functional capacity in the elderly: a population-based cohort study. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, **73**, 41–47.

V. DISCUSIÓN

1.PAPEL DE LOS EJES SOMATOTROPO, GONADAL Y ADRENAL EN LA CAPACIDAD FUNCIONAL Y EL DESARROLLO DE FRAGILIDAD EN NUESTRA POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Nuestros resultados indican que los varones presentan una situación funcional general mejor en comparación con las mujeres, y por lo tanto un mejor envejecimiento en términos de salud en los varones que en las mujeres. Ambos sexos presentan una prevalencia similar de SM (57,9% en la cohorte global, con 54,9% en varones y 61% en mujeres) y una prevalencia de obesidad del 30%. En lo referente a la evolución cronológica del perfil hormonal, a los dos años de seguimiento, se observó un descenso de DHEA y DHEAs en las mujeres y un descenso de la testosterona en los varones, mientras que los niveles de estradiol, estrona, IGF-I, IGFBP-3 y ratio IGF-I/IGFBP-3 fueron similares al inicio del estudio y a los dos años de seguimiento. Los niveles de IGF-I no cambiaron con el tiempo de seguimiento, lo que sugiere claramente, que en el rango de edad de nuestra cohorte, ya no hay un mayor descenso de los niveles con la edad, al menos en la muestra global. Llama la atención que los niveles de estradiol y estrona son superiores en varones en comparación con las mujeres, probablemente debido a la conversión periférica de la testosterona en estrógenos por los tejidos con actividad aromatasa, lo que explica la notable correlación positiva presente en hombres entre los niveles de testosterona y estradiol. Todo esto demuestra que los hombres tienen una mayor exposición o una exposición a mayores concentraciones circulantes de hormonas gonadales que las mujeres durante toda la vida, y que indudablemente ello ha de tener implicaciones en la capacidad física, mental y en el estado de ánimo cuando se considera el género. La DHEA y su sulfato son las únicas prohormonas gonadales a partir de las cuales las mujeres postmenopáusicas y las mujeres ancianas pueden obtener esteroides gonadales activos, dado su potencial de conversión bidireccional en andrógenos o estrógenos, pero siempre alcanzando concentraciones circulantes finales de los mismos claramente inferiores a los varones.

Al inicio del estudio, el estado nutricional tanto de las mujeres como los hombres era globalmente muy bueno, sin embargo durante los 2 años de seguimiento, hubo un deterioro de dicho estado nutricional y una pérdida de peso destacable en ambos sexos (el 13% de los hombres y el 20% de las mujeres presentaron una pérdida de peso >5% y presentaron un deterioro del MNA del 18% y 39% respectivamente), siendo más importante en mujeres que en hombres. Esto indica que el mantenimiento de un estado nutricional óptimo o adecuado en

poblaciones aún con alto grado de autonomía, como es la del estudio de Envejecimiento de Mataró, requiere medidas activas de preservación y lucha contra la desnutrición. La función cognitiva era normal o considerada como óptima para la edad en el 75% de las mujeres y el 86% de los hombres al principio del estudio, mientras que a los 2 años era normal en el 70,2% de las mujeres y el 85,6% de los hombres, esto es, una situación de preservación en hombres y una tendencia al deterioro en mujeres. En relación a la capacidad funcional valorada por Barthel, fue óptima en el 57,3% de los participantes al inicio del estudio y nuevamente con una muy fuerte diferencia entre hombres y mujeres (43.4% en mujeres y 71.6% en hombres) con un empeoramiento en el 27.8% de los participantes en el seguimiento.

En la situación basal, sólo en mujeres se encontró asociación entre el perfil hormonal y el estado cognitivo, con el cortisol y la DHEA, así como la asociación positiva con la IGF-I y el nivel educacional, mientras que no se halló asociación con los hombres. Por otro lado, la capacidad funcional se correlacionó con la IGF-I y el estado nutricional con la DHEA. Al valorar los cambios producidos a los 2 años de seguimiento, destaca la asociación positiva entre el MNA y el estradiol, significativo en mujeres pero no en hombres, de modo que una mayor disminución del estradiol se asocia con un mayor empeoramiento en el estado nutricional. Asimismo, el índice de Barthel se asoció en la cohorte global con la testosterona y la SHBG, siendo la asociación con la testosterona significativa en hombres pero no en mujeres y la de SHBG tanto en hombres como mujeres, de modo que un mayor descenso de testosterona en hombres y de SHBG en hombres y mujeres a los 2 años de seguimiento se asocia con mayor deterioro funcional. En relación al estado cognitivo destaca que un mayor descenso de testosterona en hombres y un mayor descenso de DHEA en mujeres se correlacionan con un mayor deterioro de la función cognitiva.

Nuestros datos muestran también que los niveles altos de IGF-I se correlacionan con mayor capacidad funcional. Asimismo, se confirma que la DHEA parece tener un papel protector, especialmente en la memoria, como ya se ha visto en otras cohortes (Ferrari, Cravello, Muzzoni, Casarotti, Paltro, Solerte, Fioravanti, Cuzzoni, Pontiggia, & Magri 2001). Otros estudios también han tratado de evaluar la relación entre los esteroides suprarrenales y la cognición en las mujeres, y en algunos de ellos la sobreexposición a cortisol se ha asociado con el deterioro cognitivo (Lupien et al 1997; Seeman et al 1997), mientras que en otros se ha encontrado una relación entre el deterioro mental y el ratio cortisol/DHEAs en lugar de con

cortisol o DHEAs individualmente, de modo que a niveles más altos del ratio habría una peor función cognitiva (Kalmijn et al 1998). De hecho, se ha propuesto a la DHEA como un neuroprotector, pero la mayoría de la información se ha obtenido en modelos experimentales en los que DHEA parece actuar contrarrestando la acción natural del cortisol, de modo que aumentarían las acciones neurotóxicas del cortisol en el hipocampo y otros sitios importantes del sistema nervioso central cuando la DHEA está disminuyendo como consecuencia de envejecimiento (Bologna et al 1987; Sapolsky et al 1990). En nuestro estudio no encontramos ninguna relación entre el ratio cortisol/DHEA o el ratio cortisol/DHEAs y la función cognitiva en el grupo de mujeres. La DHEA se ha relacionado con el estado de ánimo en las mujeres del Estudio de Bernardo Rancho (Barrett-Connor et al 1999b) y de hecho, durante los últimos años ha habido debate sobre los posibles efectos beneficiosos de la suplementación con DHEA en mujeres mayores con la finalidad de alcanzar niveles circulantes similares al de las mujeres jóvenes. Hasta la fecha no ha habido resultados consistentes que justifiquen la suplementación a largo plazo con este esteroide en la población general de mujeres ancianas (Gurnell & Chatterjee 2001; Nair et al 2006) y actualmente sólo se recomienda como tratamiento sustitutivo para las mujeres jóvenes con insuficiencia adrenal primaria, donde se ha descrito una mejoría de la autoestima, estado de ánimo y el bienestar general (Hunt et al 2000). Un metanálisis reciente que incluía 1353 hombres ancianos (Corona et al 2013) ha mostrado que la suplementación con DHEA conlleva una disminución de la masa grasa con una tendencia al aumento de la masa magra. Sin embargo, esta reducción de la masa grasa también se correlacionó con los niveles de testosterona y de estradiol, de modo que tras realizar un análisis multivariante, sólo se mantuvo significativa la asociación con la testosterona y el estradiol, pero no con la DHEA. Esto podría justificar un cierto efecto de la DHEA sobre la composición corporal, a través de sus metabolitos o la conversión de la misma en otros esteroides sexuales. Por otro lado, en este mismo metanálisis, no se observó asociación entre la suplementación con DHEA y parámetros metabólicos como los niveles de colesterol total, LDL o triglicéridos, glucosa o insulina, ni tampoco asociación con parámetros óseos, función sexual o de calidad de vida. La DHEA y la DHEAs deben considerarse pues, como prehormonas, que se convierten a nivel periférico en hormonas sexuales (especialmente testosterona y estradiol), y que ejercen sus efectos a través de sus respectivos receptores. Asimismo, debido a que la producción local de los metabolitos esteroideos activos depende de la activación enzimática en cada uno de los tejidos, el efecto biológico final de la DHEA es impredecible y en todo caso es difícil de medir (Corona, Rastrelli, Giagulli, Sila, Sforza, Forti, Mannucci, & Maggi 2013).

En nuestro estudio también observamos un efecto neuroprotector de la testosterona en los hombres. Existen datos clínicos que apoyan el papel neuroprotector de la testosterona (Bialek et al 2004) y experimentos en roedores macho que sugieren que la testosterona está vinculada a un aumento en el tamaño de las neuronas, al crecimiento neurítico, la plasticidad y la sinaptogénesis en las motoneuronas del núcleo espinal. La actividad del eje somatotropo también se asoció en nuestro caso débilmente a mejores puntuaciones cognitivas en las mujeres, hecho que también se ha descrito en otros estudios en hombres (Markowska et al 1998; Aleman et al 1999). Los niveles de IGF-I tiene efectos en la proliferación y diferenciación celular y la plasticidad en varias regiones del cerebro, existiendo datos que apoyan el papel positivo de la IGF-I a nivel de la neurogénesis y el reclutamiento de oligodendrocitos en el hipocampo, efecto que se ejercería también a través de varios sistemas de neurotransmisores (Aberg et al 2006). Sin embargo, aunque los cambios hormonales observados en el envejecimiento pueden ser de cierta importancia, la edad o el nivel educacional son factores no hormonales determinantes por sí mismos en la evolución del estado cognitivo de las personas ancianas. Por otra parte, en los varones ancianos, el tratamiento sustitutivo con GH y/o testosterona ha mostrado resultados contradictorios en relación a los cambios del estado de ánimo (Tenover 1992; Wang et al 1996; Barrett-Connor et al 1999a; Brill et al 2002). En el estudio de Brill, en el que se combinaba GH y testosterona (Brill, Weltman, Gentili, Patrie, Fryburg, Hanks, Urban, & Veldhuis 2002), se vio que las concentraciones séricas de GH, IGF-I, testosterona y estradiol aumentaban pero sin cambios en la composición corporal, la fuerza muscular, función sexual o estado de ánimo. En nuestra cohorte, los hombres se caracterizaron por estar globalmente expuestos a más factores asociados a una mejor condición psicofísica que las mujeres, con un mejor nivel académico y más horas por día de ejercicio.

Al inicio del estudio la muestra de población estudiada era bastante robusta, con un 4,6% de fragilidad, mientras que a los 2 años un 31,4% de los individuos eran frágiles. Es pues notable cómo en un espacio de tiempo no excesivamente largo la tasa de fragilidad se ha multiplicado casi x10. A nivel hormonal, el desarrollo de fragilidad se correlacionó negativamente con los niveles basales de testosterona, estradiol, IGF-I y SHBG. Sin embargo, al categorizarlo por género, sólo se vio asociación con los hombres y no en las mujeres, y esta asociación con el género masculino se mantuvo significativa tras ajustar sólo para la testosterona. Estos datos podrían explicarse por una exposición hormonal a esteroides gonadales más prolongada en los varones que en las mujeres, presentando éstas últimas globalmente una menor exposición a

los esteroides adrenales y gonadales en comparación con los hombres. En consecuencia, la fragilidad en los hombres podría explicarse, al menos parcialmente, por factores hormonales, mientras que en las mujeres otros factores hormonales en todo caso y muy probablemente factores no hormonales contribuirían al proceso de envejecimiento y en particular al desarrollo de fragilidad.

En resumen, podríamos decir que en nuestro estudio, tanto el eje somatotropo, gonadal y adrenal juegan un papel en el estado de salud, el envejecimiento y el desarrollo de fragilidad, especialmente el eje adrenal en las mujeres y los ejes somatotropo y gonadal en los varones.

2.FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO ER22/23EK DEL GEN DEL RECEPTOR DE GC Y ASOCIACIÓN DEL MISMO CON LA FUERZA MUSCULAR, CAPACIDAD FUNCIONAL, ESTADO MENTAL Y NUTRICIONAL, Y LA PRESENCIA DE LOS DISTINTOS COMPONENTES DEL SM.

En nuestra población sólo encontramos una prevalencia de ER22/23EK para el polimorfismo del receptor de GC del 2,5% (8/309: 4 casos en varones y 4 casos en mujeres), inferior a la encontrada en otras cohortes (2% vs 8% en el estudio de Rotterdam) (van Rossum & Lamberts 2004;van Rossum, Feelders, van den Beld, Uitterlinden, Janssen, Ester, Brinkmann, Grobbee, de Jong, Pols, Koper, & Lamberts 2004a;van Rossum et al 2008). Esta baja representación de dicho polimorfismo no nos ha permitido establecer asociaciones específicas como se hizo en los estudios de Rotterdam por falta de potencia estadística. Así, no se observaron diferencias significativas en las variables antropométricas y los componentes del SM entre los portadores y los no portadores, salvo una menor prevalencia de hipertensión en los portadores. Tampoco se hallaron diferencias en los parámetros funcionales, nutricionales, cognitivos y hormonales entre los dos grupos. La ausencia de significación en todos estos parámetros podría deberse como ya hemos comentado a la falta de potencia del estudio por la inesperada baja prevalencia de este polimorfismo. En nuestra población, a diferencia de lo que se observó en el estudio de Rotterdam, vimos una asociación con la hipertensión, menos prevalente en los portadores, mientras que el grupo de Rotterdam no se encontró esta asociación (van Rossum, Koper, Huizenga, Uitterlinden, Janssen, Brinkmann, Grobbee, de Jong, van Duyn, Pols, & Lamberts 2002). Los datos del estudio holandés sugieren que los portadores de este polimorfismo presentan un cierto grado de resistencia a los GC, asociado a un perfil

metabólico más favorable con menor colesterol total y LDL, menores niveles de insulina y glucosa (van Rossum, Koper, Huizenga, Uitterlinden, Janssen, Brinkmann, Grobbee, de Jong, van Duyn, Pols, & Lamberts 2002), datos que no vimos en nuestra cohorte, y una menor prevalencia de hipertensión, que sí objetivamos en nuestra muestra. El grado de resistencia en estos pacientes es menor a la que se produce en aquellos sujetos con resistencia a GC típica y mutaciones reconocidas, ya que no se ve hipertensión ni hipopotasemia o acné debido a aumento de andrógenos suprarrenales (Lamberts et al 1992). Igualmente, en el estudio de Rotterdam también observó que los portadores de ER22/23EK eran más altos, tenían más masa magra y mayor fuerza muscular en brazos y piernas en comparación con los no portadores (van Rossum, Voorhoeve, te Velde, Koper, Delemarre-van de Waal HA, Kemper, & Lamberts 2004b); asimismo, en las mujeres el perímetro de cintura y cadera eran menores en las portadoras, sin diferencias en el IMC (van Rossum, Voorhoeve, te Velde, Koper, Delemarre-van de Waal HA, Kemper, & Lamberts 2004b). El hecho de que los portadores sean más altos podría deberse a que la pubertad está algo retrasada en comparación con los no portadores, ya que este polimorfismo se asociaría a una resistencia relativa a los GC, por lo que existiría una menor inhibición del crecimiento, y por lo tanto una mayor talla final (van Rossum, Voorhoeve, te Velde, Koper, Delemarre-van de Waal HA, Kemper, & Lamberts 2004b). Estudios más recientes han visto que las gestantes portadoras de este polimorfismo presentan menor ganancia ponderal durante el embarazo (Bertalan et al 2009) y que los niños pretérmino portadores de la variante 23K muestran una recuperación de la altura entre los 3 meses y el año alcanzando una altura similar a la población de referencia, por lo que este polimorfismo actuaría probablemente como protector, al menos parcialmente, contra el deficiente crecimiento postnatal en los nacidos pretérmino (Finken et al 2007). Finalmente, ER22/23EK tiene en los sujetos del estudio de Rotterdam un efecto protector para el riesgo de demencia (van Rossum, de Jong, Koper, Uitterlinden, Prins, van Dijk, Koudstaal, Hofman, de Jong, Lamberts, & Breteler 2008) y se asocia a una mayor supervivencia (van Rossum, Feelders, van den Beld, Uitterlinden, Janssen, Ester, Brinkmann, Grobbee, de Jong, Pols, Koper, & Lamberts 2004a).

Existen varias hipótesis sobre el mecanismo a través del cual actuaría este polimorfismo. Una de ellas sería que el cambio de aminoácido en el codón 23 (arginina a lisina) provocaría modificaciones en la estructura terciaria del receptor, con consecuencias funcionales sobre el dominio de transactivación, y esto podría influir en la actividad transactivacional y/o transrepresiva, con una reducción neta de la capacidad de transactivación (Russcher et al

2005a). También se ha visto que produciría cambios en la estructura secundaria del ARNm, que llevaría a una menor formación de la isoforma A transcripcionalmente activa del receptor de GC (Russcher et al 2005b).

3.FRECUENCIA DE LA VARIANTE ALÉLICA 192 PB DEL PROMOTOR DEL GEN DE IGF-I Y SU ASOCIACIÓN CON LA FUERZA MUSCULAR, CAPACIDAD FUNCIONAL, ESTADO MENTAL Y NUTRICIONAL, Y LA PRESENCIA DE LOS DISTINTOS COMPONENTES DEL SM.

El eje somatotropo está indudablemente implicado en el proceso de envejecimiento saludable, pudiendo influir en el desarrollo de enfermedades que inciden en la longevidad y la supervivencia con un efecto en forma de U (Brugts, van den Beld, Hofland, van der, van Koetsveld, Frystyk, Lamberts, & Janssen 2008). Así, niveles circulantes de IGF-I en el rango superior de la normalidad se han asociado con una mayor prevalencia de cáncer de próstata y de colon, así como aumento de la masa muscular y la fuerza muscular (Zecevic, Amos, Gu, Campos, Jones, Lynch, Rodriguez-Bigas, & Frazier 2006), mientras que niveles bajos están presentes en los individuos ancianos y frágiles con diferente grados de discapacidad (Cappola, Bandeen-Roche, Wand, Volpato, & Fried 2001) y en la mortalidad prematura (Cappola, Xue, Ferrucci, Guralnik, Volpato, & Fried 2003).

Por otra parte, algunas investigaciones también han demostrado la existencia de un patrón de genotipo específico relacionado con la edad y la disminución de los niveles de IGF-I e IGFBP-3 en portadores homocigotos del alelo 192 pb de la región promotora del gen de IGF-I (Rietveld, Janssen, Hofman, Pols, van Duijn, & Lamberts 2003), que condicionaría un mayor descenso en los niveles de IGF-I con la edad. Este polimorfismo se encuentra 1 Kb por encima de la zona transcripcional y contiene elementos reguladores específicos que pueden modificar la actividad transcripcional de IGF-I, dando como resultado diferentes niveles circulantes de IGF-I (West et al 1996).

En nuestro estudio observamos que la prevalencia de la variante alélica de 192 pb del promotor del gen de IGF-I era del 41,9% de homocigotos, 44,3% heterocigotos y 13,9% de no portadores, frecuencias relativamente parecidas a las encontradas por el grupo de Rotterdam (con 23% de no portadores, 39,6% de heterocigotos y 37,4% de homocigotos) (Rietveld,

Janssen, Hofman, Pols, van Duijn, & Lamberts 2003). No observamos correlación de los niveles de IGF-I con la edad para las distintas variantes 192 pb IGF-I, mientras que en el estudio de Rietveld los homocigotos presentaron un mayor descenso de las concentraciones de dicho péptido con la edad (Rietveld, Janssen, Hofman, Pols, van Duijn, & Lamberts 2003). Sin embargo, en el estudio de Rietveld y colaboradores, los individuos eran más jóvenes que nuestra muestra, con edades de entre 60 y 75 años, mientras que en nuestra cohorte la edad de los sujetos variaba de 70 a 85 años, por lo que sería factible que en este rango de edad más avanzada ya no quepa esperar una mayor disminución de IGF-I, por lo menos mediada por GH. Por otra parte, no todos los estudios publicados hasta la fecha han demostrado una asociación de este polimorfismo y los niveles circulantes de IGF-I: algunos estudios han mostrado niveles más bajos de IGF-I en homocigotos en comparación con heterocigotos y no portadores (Frayling et al 2002), mientras que otros estudios han mostrado niveles similares (Allen et al 2002). La discrepancia de estos resultados podrían deberse al azar, factores de confusión desconocidos, variaciones en los patrones de desequilibrio entre las poblaciones, diferentes diseños de estudio y a los métodos para medir IGF-I (Fletcher et al 2005; Hovind et al 2007). Otro dato interesante es que en el estudio de Rietveld (Rietveld et al 2004) se observó una asociación entre este polimorfismo con la altura, de modo que los homocigotos eran más altos, lo que podría reflejar un mayor tiempo de exposición a la IGF-I; esta relación no la encontramos en nuestra cohorte. Esto podría explicarse por el origen social de los sujetos, correspondiente a los inmigrantes procedentes del sur de España que sufrieron un acceso limitado a los alimentos durante su infancia en la década de 1945-1955 debido a la postguerra. De hecho, la media de altura en los hombres fue 164 cm y 153 cm para las mujeres, sin diferencias observadas de acuerdo con el genotipo. A favor de esta interpretación está el hecho que la altura media de la población española post-adolescente ha aumentado cerca de 10 cm desde los años 70 hasta ahora (Carrascosa et al 2008). Además, otros estudios también han demostrado el efecto de las crisis agrarias y la Segunda Guerra Mundial sobre la tendencia histórica de crecimiento (van Wieringen et al 1985) que refleja la influencia de la genética y de los factores ambientales sobre el crecimiento y la estatura final.

Desde un punto de vista metabólico, nuestro estudio observó que los homocigotos presentaban una tendencia a menor obesidad central en comparación con los heterocigotos y no portadores considerados de forma agrupada (62% vs 72,1%), así como una menor prevalencia de SM (41,9% vs 54,9%); sin embargo no vimos diferencias en el perfil lipídico, glicémico o la tensión arterial. Valorado por género, se vio que las mujeres homocigotas

presentaron una tendencia a una menor presión arterial y mejor HDL. No se observaron diferencias en la prevalencia de diabetes, enfermedad cardio o cerebrovascular para las diferentes variantes alélicas. En cambio, los datos de Vaessen et al (Vaessen, Heutink, Janssen, Witteman, Testers, Hofman, Lamberts, Oostra, Pols, & van Duijn 2001) sugieren que los niveles relativamente bajos de IGF-I genéticamente determinados se asocian con mayor riesgo de DM2 y de infarto de miocardio. Estas diferencias entre nuestros datos y los resultados de Rotterdam podrían deberse a un seguimiento temporal insuficiente o a una falta de poder estadístico. Aunque existe un número considerable de estudios que apoyan el papel protector de IGF-I en las enfermedades CV y metabólicas (Juul et al 2002;Laughlin, Barrett-Connor, Criqui, & Kritz-Silverstein 2004;Schutte et al 2010), se han publicado resultados contradictorios en relación a la influencia de los niveles de IGF-I en la vulnerabilidad metabólica y la composición corporal (Kiel et al 1998). Un estudio reciente explorando niños en la primera infancia no encontró diferencias en el IMC, la masa grasa y el índice cintura-cadera en relación a los genotipos de IGF-I (Maas et al 2010). Al igual que en nuestro estudio, Perticone et al. (Perticone et al 2008) también observó una correlación negativa entre los niveles de IGF-I y la presión arterial sistólica y una correlación positiva con HDL. No podemos explicar estas diferencias entre sexos, pero un posible sesgo de supervivencia puede haber contribuido a sobrerrepresentar a las mujeres con una mejor el perfil metabólico en nuestra cohorte.

Tomados en conjunto, nuestros datos sugieren que los homocigotos tienen un perfil metabólico más favorable en comparación con los no homocigotos, y aunque no se observan diferencias con respecto a la enfermedad cardio y cerebrovascular, esto podría deberse a un sesgo de supervivencia. Además, en nuestra cohorte, los individuos con enfermedad cardiovascular tenían los mismos niveles circulantes de IGF-I, pero una IGFBP-3 y GH basal menores en los pacientes con enfermedad coronaria activa.

Adicionalmente, observamos que existe una asociación entre los parámetros funcionales y los polimorfismos de promotor del gen de IGF-I en nuestra población. En el caso de la capacidad mental, los homocigotos presentaban un MMSE normal en mayor proporción que los heterocigotos y los no portadores al realizar el análisis crudo, pero tras ajustar por edad, sexo e IMC, dejó de ser significativo. En el caso del estado nutricional, los homocigotos presentaban un MNA satisfactorio en mayor proporción que las otras dos variantes, pero en este caso la asociación permaneció significativa tras ajustar por diversos factores de confusión. También se vio que los homocigotos tenían una mejor capacidad funcional evaluada por Barthel, pero esta

asociación también se asoció a los niveles de IGF-I, por lo que tras ajustar por esta variable, la asociación entre Barthel y el polimorfismo fue casi significativa. No se vieron diferencias con la fuerza muscular. Al categorizar por sexo, el MNA fue mejor en los hombres homocigotos y el Barthel fue mejor en las mujeres homocigotas, pero no se vieron diferencias en las otras variables. Es bien conocido el papel de GH en la función mental (Aleman & Torres-Aleman 2009; Quik et al 2010), donde una exposición prolongada a niveles bajos de IGF-I podría asociarse a una peor función cognitiva en la vejez. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que ha descrito una relación entre los polimorfismos en el promotor del gen de IGF-I y los estados nutricional, cognitivo y funcional. Si aceptamos que la información del genotipo es más relevante que una sola medición de IGF-I, los homocigotos para 192 pb estarían vinculados a una disminución mantenida de IGF-I, y sería tentador especular que este rasgo genético puede tener una influencia diferencial para el envejecimiento saludable. Sin embargo, un estudio muy reciente ha confirmado que los homocigotos presentan niveles más bajos de IGF-I en comparación con los heterocigotos o los no portadores, pero sin apreciarse asociación entre los polimorfismos y la función cognitiva (Licht et al 2014).

A pesar de los beneficios observados en los homocigotos en relación a la capacidad funcional, en nuestra cohorte no se observó una relación con la fuerza muscular, un marcador reconocido de fragilidad en el envejecimiento. Esto coincide con la falta de relación de los niveles de IGF-I y la fuerza muscular en nuestra muestra y en otras (Hand et al 2007). Sin embargo, otros estudios han encontrado una influencia positiva de este polimorfismo en la fuerza muscular (Kostek et al 2005). Nuestro estudio, a diferencia del de Kostek, sólo evaluó la fuerza muscular basal, mientras que en el previo se observó que los homocigotos tenían una mejor respuesta tras el entrenamiento; en este estudio en particular, el volumen muscular basal y la calidad del mismo no fueron diferentes por el genotipo.

En conclusión, la homocigocidad para la variante alélica de 192 pb del promotor del gen de IGF-I podría ser un marcador de envejecimiento más saludable en los ancianos del Estudio de Envejecimiento de Mataró, con menor prevalencia de SM y mejor capacidad funcional.

4.FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA GHRELINA Y SU ASOCIACIÓN CON EL ESTADO MENTAL Y LA PRESENCIA DE LOS DISTINTOS COMPONENTES DEL SM.

La asociación entre los polimorfismos de la ghrelina y los componentes del SM han sido un tema de interés en los últimos años, sin embargo, existen pocos datos sobre su asociación en los ancianos. En nuestro estudio investigamos la asociación entre seis polimorfismos de la ghrelina (-994CT (rs26312), -604GA (rs27647), -501AC (rs26802), R51Q (rs34911341), M72L (rs696217) y L90G (rs4684677)) y los componentes del SM en ancianos caucásicos que participaban en los estudios de Mataró y Río Hortega (Mena-Martin et al 2003;Puig-Domingo, Serra-Prat, Merino, Pubill, Burdoy, & Papiol 2008). La frecuencia de los distintos polimorfismos fue similar en ambos sexos y todos estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. En la submuestra de Mataró no encontramos asociación entre los niveles plasmáticos de ghrelina total y los 6 polimorfismos estudiados, al igual como sucede con otros autores en relación con la ghrelina total y la acil-ghrelina y los polimorfismos M72L y L90G (Vivenza, Rapa, Castellino, Bellone, Petri, Vacca, Aimaretti, Broglio, & Bona 2004;Ando et al 2007). Sin embargo, Ukkola et al (Ukkola, Ravussin, Jacobson, Perusse, Rankinen, Tschop, Heiman, Leon, Rao, Skinner, Wilmore, Sjostrom, & Bouchard 2002) encontraron niveles más bajos de ghrelina en los sujetos con Arg51Gln. Nosotros no pudimos medir los niveles de acil-ghrelina, la cuál parece estar asociada a las acciones metabólicas de la ghrelina, aunque esta idea no está del todo aclarada en comparación con la desacil-ghrelina; es posible que en el caso de la acil-ghrelina tengan más importancia la variantes génicas de la GOAT –el enzima acilador-, más que las del gen de la ghrelina (Liu, Garcia, & Korbonits 2011). Todavía no se conocen las consecuencias funcionales de las variantes de los 6 polimorfismos, pero parece que las variantes de -604CT (localizado en la región promotora del gen de la ghrelina) y el M72L (entre la ghrelina madura y la obestatina) no se asocian con cambios en la ghrelina madura, pero estas variantes podrían modular el procesamiento de la proteína, la estabilidad del ARNm y podría modificar la secreción o actividad de la ghrelina. La variante L90G se ha asociado a cambios en la obestatina, pero todavía no se han llevado a cabo estudios que lo repliquen. Estudios recientes han encontrado que tanto -994CT (Moreno et al 2010), como M72L y -604CT influyen en la expresión del gen de la ghrelina, pero no L90G (Zavarella, Petrone, Zampetti, Gueorguiev, Spoletini, Mein, Leto, Korbonits, & Buzzetti 2008).

Nuestros datos muestran varias asociaciones entre componentes del SM y los distintos polimorfismos de la ghrelina. Los genotipos A/C+A/A de M72L y A/A de -604GA se asociaron con mayor obesidad central, mientras que el A/A del -501AC se asoció con menor IMC. En relación al perfil lipídico vimos que el genotipo A/A de -604GA se asociaba con niveles más bajos de CT y de LDL y el genotipo A/A de -501AC con menores niveles de TG y menor prevalencia de componentes de SM. Sin embargo, no vimos ninguna asociación con la presencia de hipertensión o alteración del metabolismo de la glucosa o la presencia de SM. Respecto al análisis por género, los varones con el genotipo A/G de R51Q presentaban mayor perímetro de cintura, y los que presentaban el genotipo A/A de -604GA y A/C de M72L tenían mayor obesidad central y más SM. En cambio, las mujeres con el genotipo C/C de -501AC tenían más sobrepeso y las que presentaban el genotipo A/A de L90G y C/C de -501AC tenían mayor perímetro de cintura. En relación al perfil lipídico, las mujeres con el genotipo A/A de -604GA o C/C de -501AC tenían menores niveles de CT y LDL. En resumen, los genotipos A/C+A/A de M72L se asociaron con mayor obesidad central, A/A de -604GA con mayor obesidad central y menores niveles de CT y LDL y genotipo A/A de -501AC con menor IMC, niveles bajos de TG y menos componentes de SM. El análisis por haplotipos también confirmó la influencia de los polimorfismos de la ghrelina y alguno de los componentes del SM, especialmente el perímetro de cintura y la obesidad central, donde el haplotipo 4 mostraba una fuerte asociación de riesgo.

Todos estos datos sugieren la relevancia de los polimorfismos de la ghrelina en las variables antropométricas y con los parámetros relacionados con el perfil lipídico, pero no con parámetros como del metabolismo de la glucosa y la presión arterial, al menos en nuestra población de ancianos. Además, estas asociaciones también están influidas por el género, ya que alguna de ellas sólo está presente en hombres o mujeres. De todos modos, estos resultados deben interpretarse con cautela, dado el tamaño de la muestra de nuestro estudio y la baja prevalencia de aparición de algunos genotipos.

Otros autores han observado resultados diversos al evaluar los componentes del SM y los polimorfismos de la ghrelina (ver tabla 1 donde se exponen las asociaciones descritas previamente) y existe poca información en relación con el polimorfismo -501AC. Hubacek et al (Hubacek, Adamkova, Bohuslavova, Suchanek, Poledne, & Lanska 2008) ha estudiado la asociación de este SNP y el IMC sin encontrar asociación, mientras que Vartiainen et al en el

estudio OPERA (Vartiainen, Kesaniemi, & Ukkola 2006) sí han encontrado asociación. También se han estudiado otros polimorfismos en relación a la obesidad y el IMC, especialmente el M72L, y mientras algunos autores han encontrado una asociación positiva (Ukkola, Ravussin, Jacobson, Perusse, Rankinen, Tschop, Heiman, Leon, Rao, Skinner, Wilmore, Sjostrom, & Bouchard 2002; Miraglia del, Santoro, Cirillo, Raimondo, Grandone, D'Aniello, Di, & Perrone 2004; Vivenza, Rapa, Castellino, Bellone, Petri, Vacca, Aimaretti, Broglio, & Bona 2004; Kuzuya, Ando, Iguchi, & Shimokata 2006), otros no han encontrado relación alguna (Sorensen, Boutin, Taylor, Larsen, Verdich, Petersen, Holst, Echwald, Dina, Toubro, Petersen, Polak, Clement, Martinez, Langin, Oppert, Stich, Macdonald, Arner, Saris, Pedersen, Astrup, & Froguel 2006; Wang, Wang, Zhao, Shi, Wang, & Chen 2009; Zhu, Liang, Zou, & Fu 2010).

En relación al perfil lipídico, mientras M72L se ha asociado con el HDL (Steinle, Pollin, O'Connell, Mitchell, & Shuldiner 2005; Hubacek, Bohuslavova, Skodova, & Adamkova 2007) y los TG (Hubacek, Bohuslavova, Skodova, & Adamkova 2007), no se ha encontrado asociación con -501AC (Hubacek, Bohuslavova, Skodova, & Adamkova 2007; Martin, Loredó, & Sun 2008) o R51Q (Hubacek, Bohuslavova, Skodova, & Adamkova 2007). Sin embargo, nuestros datos han mostrado que el genotipo A/A -501AC se asocia con niveles más bajos de TG y el genotipo -604GA con niveles menores de CT y LDL, sin datos en la bibliografía en referencia a este último polimorfismo y el perfil lipídico para que podamos contrastarlo.

Algunos estudios han mostrado un papel protector de M72L para la diabetes (Mager, Lindi, Lindstrom, Eriksson, Valle, Hamalainen, Ilanne-Parikka, Keinanen-Kiukaanniemi, Tuomilehto, Laakso, Pulkkinen, & Uusitupa 2006b; Berthold, Giannakidou, Krone, Mantzoros, & Gouni-Berthold 2009; Liao, Xie, Huang, & Xie 2013), que puede estar asociado a través de un efecto sobre la resistencia a la insulina, incrementando su sensibilidad (Korbonits, Gueorguiev, O'Grady, Lecoeur, Swan, Mein, Weill, Grossman, & Froguel 2002; Zavarella, Petrone, Zampetti, Gueorguiev, Spoletini, Mein, Leto, Korbonits, & Buzzetti 2008), mientras que otros no han encontrado dicha asociación (Choi, Cho, Moon, Choi, Shin, Jang, Kim, Lee, & Park 2006; Liu, Liu, Tian, Liu, Bing, Zhang, Wang, & Zhang 2012). En nuestra muestra, no encontramos asociación con la diabetes o la glicemia. Esto podría deberse a la relativamente baja prevalencia de diabetes en nuestra muestra (13,9%) en comparación a la mayor parte de estudios en los que a partir de los 65-70 años de edad, sitúan la prevalencia en torno o por encima del 20% (Soriguer et al 2012).

En relación al SM, los portadores del genotipo A/A de -604GA y de A/C del M72L presentaron una mayor prevalencia de obesidad central y de SM de acuerdo con los criterios de IDF, pero esta asociación sólo la observamos en los varones. Resultados contradictorios se han publicado previamente: algunos han mostrado asociación de M72L con mayor prevalencia de SM (Steinle, Pollin, O'Connell, Mitchell, & Shuldiner 2005; Xu, Xiang, Qiu, & Xu 2008) y otros no han visto asociación (Bing, Ambye, Fenger, Jorgensen, Borch-Johnsen, Madsbad, & Urhammer 2005; Zhu, Liang, Zou, & Fu 2010).

En nuestra cohorte de ancianos socialmente no-dependientes del Estudio de Mataró, las variantes del gen de la ghrelina se asocian a componentes del SM, en particular con mayor obesidad central los genotipos A/C+A/A de M72L y A/A de -604GA y con mejor perfil lipídico, los genotipos A/A de -604GA y A/A de -501AC.

Por otro lado, en nuestro estudio también hemos analizado la relación de los polimorfismos de la ghrelina y el estado cognitivo. Dada la asociación descrita entre obesidad y SM con el deterioro cognitivo (Whitmer et al 2005; Raffaitin et al 2009) y la asociación de los polimorfismos de la ghrelina con la obesidad y el SM previamente descrita, así como los recientes resultados sobre el papel que la ghrelina ejerce de forma directa sobre el estado cognitivo (Andrews 2011), resultaba interesante conocer la asociación entre los polimorfismos de la ghrelina y el estado cognitivo.

En nuestro estudio hemos observado que hay una asociación inversa entre el estado cognitivo medido con MMSE y el IMC, el perímetro de cintura y los triglicéridos, pero esta asociación deja de ser significativa tras ajustar por edad, sexo y nivel educacional. Cuando quisimos ver la asociación con los componentes del SM observamos una asociación con la glucosa alterada, y dicha asociación se mantenía significativa tras ajustar. No hemos hallado asociación entre los niveles de ghrelina y ninguno de los seis polimorfismos estudiados, sin embargo sí observamos que la puntuación en el MMSE se asociaba con los polimorfismos M72L y L90G. El genotipo C/A de M72L se asociaba con menor puntuación en comparación con el genotipo C/C y el genotipo A/T de L90G se asoció con menor puntuación en comparación con el A/A, y dicha asociación se mantuvo significativa tras ajustar por los distintos confusores. Cuando estudiamos la asociación entre los polimorfismos de la ghrelina y el deterioro cognitivo

(MMSE<24), encontramos una asociación con L90G, de modo que los individuos con el genotipo A/T de L90G tenían en mayor proporción un MMSE<24 en comparación con los que presentaban el genotipo A/A.

De modo que encontramos una asociación entre el MMSE y la alteración de glucosa y los polimorfismos M72L y L90G, y estas asociaciones se mantienen significativas tras ajustar por edad, sexo, nivel educacional, la depresión medida por GDS (geriatric depression scale) y genotipo de apolipoproteína E (ApoE), lo cual indica que estos polimorfismos de la ghrelina tienen una asociación independiente con el estado cognitivo en los individuos pertenecientes al Estudio de Envejecimiento de Mataró.

Algunos estudios han encontrado un papel deletéreo del SM en el estado cognitivo. En relación al metabolismo de la glucosa, una revisión de estudios observacionales (Cukierman-Yaffe et al 2009) sugiere que las personas con diabetes tienen un mayor riesgo de deterioro cognitivo. Los diabéticos parecen tener un volumen del hipocampo y del lóbulo prefrontal reducido (Bruehl et al 2009), lo que podría causar alteraciones en la memoria verbal. Esta pérdida del volumen hipocampal en los diabéticos podría deberse a la hiperglicemia, a la formación de productos avanzados de la glicación, así como a la elevación de citoquinas proinflamatorias como la IL-6 en la obesidad y la disfunción endotelial. En nuestra cohorte hemos comprobado un efecto deletéreo de la glucosa sobre la puntuación en el MMSE. Cuando analizamos los sujetos diabéticos individualmente, también se observaba una tendencia significativa. El hecho que no sea significativo podría deberse a un efecto de la edad, ya que los individuos diabéticos eran más ancianos que la cohorte con glucosa en ayunas >100 mg/dl, y un mayor poder estadístico del grupo con glucosa alterada en ayunas por criterios de ATP-III en comparación con el grupo de diabetes.

Otros componentes del SM como la resistencia de la insulina, así como el SM como tal, se han asociado al deterioro cognitivo (Raffaitin, Gin, Empana, Helmer, Berr, Tzourio, Portet, Dartigues, Alperovitch, & Barberger-Gateau 2009; Yaffe et al 2009; Akbaraly et al 2010). La asociación entre el IMC y la demencia es controvertido; mientras un estudio ha mostrado que el IMC se asocia con menor volumen cerebral pero sin efectos sobre la cognición (Ward et al 2005), otro vio que un mayor IMC se asociaba a menor riesgo de demencia (Hughes et al

2009). Sin embargo, la asociación entre demencia y obesidad central parece más consistente (West & Haan 2009). En los menores de 75 años, el IMC y la adiposidad central mostraron una asociación en forma de U con el riesgo de demencia, por lo que valores de IMC muy bajos y muy altos se asociaron con peor función cognitiva; esta relación es difícil de interpretar en los estudios transversales, ya que los individuos con demencia generalmente pierden peso tras el diagnóstico (Luchsinger et al 2007). Esta asociación dual del efecto tanto protector como deletéreo de la obesidad en el estado cognitivo en relación con la edad, podría indicar que habría una susceptibilidad individual que modularía dicha asociación. De modo que en aquellos individuos predispuestos a sufrir un deterioro cognitivo, la obesidad podría actuar como un acelerador, mientras que en aquellos resistentes o que no tengan la susceptibilidad y que hayan sobrevivido a la obesidad tras los 70 años, esta condición podría no ser ya deletérea sino protectora.

Igualmente, también podría ser posible un efecto indirecto de la ghrelina/obestatina sobre el desarrollo del SM y sobre la función cognitiva. Previamente ya habíamos descrito la relación entre la ghrelina y distintas condiciones asociadas al envejecimiento (Serra-Prat, Fernandez, Burdoy, Mussoll, Casamitjana, & Puig-Domingo 2007; Serra-Prat, Alfaro, Palomera, Casamitjana, Buquet, Fernandez-Fernandez, & Puig-Domingo 2009a; Serra-Prat, Palomera, Roca, & Puig-Domingo 2010). En uno de los subestudios del Estudio de Envejecimiento de Mataró encontramos que el hambre y la pérdida de peso estaban influidos por los niveles de ghrelina (Serra-Prat, Palomera, Roca, & Puig-Domingo 2010). Un estudio reciente ha valorado el papel de la ghrelina en la función cognitiva en población sin demencia; en una muestra de 35 individuos, los niveles de acil-ghrelina eran más altos en sujetos con menor MMSE. En los sujetos estudiados por nosotros, no hemos observado diferencias en los niveles de ghrelina total en función del estado cognitivo. Esto podría deberse al valor limitado que puede tener una única determinación de ghrelina, una hormona que fluctúa a lo largo del día y en función del estado prandial y de ayuno, así como al hecho de que medimos ghrelina total en lugar de acil-ghrelina. Se ha visto que en los pacientes con EA hay una expresión alterada de la ghrelina, de modo que una baja expresión en el lóbulo temporal podría tener implicaciones causales en cuanto al déficit cognitivo (Gahete, Rubio, Duran-Prado, Avila, Luque, & Castano 2010). Los datos procedentes de modelos animales muestran que la administración intrahipocampal de ghrelina en ratones produce una mejora de la disfunción cognitiva asociada a la inyección de amiloide (Moon, Choi, Nam, Hong, Choi, Oh, & Mook-Jung 2011). La interpretación de todos estos datos es difícil dado el escaso número de los estudios publicados

al respecto, sin embargo, una asociación parece plausible pero se requieren más investigaciones, tanto clínicas como experimentales. Además, la obestatina (Zhang, Ren, vsian-Kretchmer, Luo, Rauch, Klein, & Hsueh 2005), cuyos datos reportados hasta la actualidad sugieren que podría jugar un papel contraregulador de la ghrelina, podría también modular las acciones de la ghrelina a nivel cognitivo, sin embargo no existen prácticamente evidencias sobre su papel en la función cognitiva. A diferencia de lo podría parecer, los datos actuales parecen indicar que la obestatina tendría un papel protector sobre la función cognitiva en ratas, al igual que la ghrelina (Carlini, Schioth, & Debarioglio 2007). Además, el polimorfismo L90G se ha relacionado con la expresión de obestatina (Zhang, Ren, vsian-Kretchmer, Luo, Rauch, Klein, & Hsueh 2005;Zavarella, Petrone, Zampetti, Gueorguiev, Spoletini, Mein, Leto, Korbonits, & Buzzetti 2008). Y un estudio reciente en población japonesa ha descrito una asociación entre L90G y la EA (Shibata, Ohnuma, Kuerban, Komatsu, & Arai 2011). Que nosotros sepamos, este es el primer estudio que muestra una asociación entre los polimorfismos de la ghrelina y el MMSE, especialmente en relación a M72L y L90G.

Podemos decir que, al menos en nuestro Estudio de Envejecimiento de Mataró, algunos factores metabólicos se asocian con el MMSE, especialmente alteraciones en el metabolismo de la glucosa, y algunos de los polimorfismos de la ghrelina, especialmente los genotipos C/A de M72L y A/T de L90G, se han asociado a peor función cognitiva.

Las asociaciones entre los polimorfismos de la ghrelina y los parámetros metabólicos y funcionales hallados en nuestro estudio, quedan reflejadas de forma resumida en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de las asociaciones entre los polimorfismos de la ghrelina y los parámetros funcionales hallados en nuestro estudio.

	-994CTrs26312 C/C	-604rs2764 A/A	501rs26802 A/A	Arg51Gln G/G	Leu72Met rs696217 C/C	Gln90Leu rs4684677 A/A
Obesidad central	ns	Riesgo	ns	ns	Protector	ns
IMC	ns	ns	Protector	ns	ns	ns
CT	ns	Protector	ns	ns	ns	ns
LDL	ns	Protector	ns	ns	ns	ns
HDL	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TG	ns	ns	Protector	ns	ns	ns
HTA	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Metabolismo glucosa	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Componentes SM	ns	ns	Menor número	ns	ns	ns
SM	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MMSE	ns	ns	ns	ns	Protector	Protector

IMC: índice masa corporal; CT: colesterol total; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; TG: triglicéridos; HTA: hipertensión arterial; SM: síndrome metabólico; MMSE: MiniMental State Examination; ns: no significativo.

5. PAPEL DE LA OBESTATINA EN EL ESTADO NUTRICIONAL, HAMBRE, RIESGO DE SM Y DETERIORO FUNCIONAL EN LA MUESTRA POBLACIONAL DEL ESTUDIO DE ENVEJECIMIENTO DE MATARÓ.

Aunque existen numerosos datos en relación al papel metabólico de la ghrelina, existen pocos en referencia a la obestatina, y los inicialmente publicados mostraron ciertas contradicciones pero parecían indicar efectos contrapuestos de ambos péptidos; mientras la ghrelina tendría un efecto orexigénico, la obestatina tendría un efecto anorexigénico (Zhang, Ren, vsian-Kretchmer, Luo, Rauch, Klein, & Hsueh 2005;Bresciani et al 2006). Sin embargo, no todos los

datos hasta la fecha han demostrado este efecto contrapuesto (Seoane et al 2006;Nogueiras, Pfluger, Tovar, Arnold, Mitchell, Morris, Perez-Tilve, Vazquez, Wiedmer, Castaneda, DiMarchi, Tschop, Schurmann, Joost, Williams, Langhans, & Dieguez 2007). Además, datos recientes indican que el efecto anorexigénico que tendría la obestatina no se debería a un efecto directo sobre el hambre, sino a un efecto indirecto inhibiendo el efecto orexigénico de la ghrelina, por lo que la obestatina regularía las acciones endógenas de la ghrelina (Zizzari, Longchamps, Epelbaum, & Bluet-Pajot 2007).

En nuestro estudio hemos evaluado la influencia potencial de la obestatina en la conducta alimentaria, la anorexia y la pérdida de peso en mujeres ancianas, pero no observamos asociación entre los niveles de ghrelina u obestatina con la anorexia, el MNA o los cambios de MNA a los dos años de seguimiento ni con la pérdida de peso en este periodo. La anorexia es un hallazgo frecuente en el envejecimiento, y la misma puede contribuir al desarrollo de fragilidad debido a la pérdida de las reservas nutricionales. El efecto anorexigénico atribuido a la obestatina le convierte en un buen candidato para contribuir a la etiología del desarrollo de la anorexia del envejecimiento. Hasta donde sabemos, no existen estudios de seguimiento en humanos, ni en jóvenes ni ancianos, que demuestren una relación causal de la obestatina con la anorexia. A nivel transversal se ha evaluado la asociación entre obestatina y obesidad en humanos, objetivando resultados controvertidos. Por ejemplo, Vicennati et al (Vicennati, Genghini, De, Pasqui, Pagotto, & Pasquali 2007) describieron niveles altos en mujeres obesas mientras Guo et al (Guo, Zheng, Qin, Hu, Chen, & Zhang 2007) observaron niveles bajos. En relación a anorexia, dos estudios diferentes mostraron niveles altos de obestatina (Monteleone et al 2008;Nakahara, Harada, Yasuhara, Shimada, Amitani, Sakoguchi, Kamiji, Asakawa, & Inui 2008) que sugerían que este producto del gen de la ghrelina puede ser un inhibidor del hambre. En este estudio también se vio una correlación negativa de los niveles de obestatina con el IMC. En nuestro estudio no se vio correlación entre los niveles de obestatina y el IMC, aunque sí con la ghrelina o el ratio ghrelina/obestatina, como también se ha observado en otros estudios, con una correlación de tipo positivo (Guo, Zheng, Qin, Hu, Chen, & Zhang 2007) y negativa (Vicennati, Genghini, De, Pasqui, Pagotto, & Pasquali 2007). Estos últimos hipotetizan que los cambios en los niveles circulantes de ghrelina y obestatina representan cambios adaptativos del desarrollo de obesidad, más que defectos primarios, y que su alteración en los niveles circulantes reflejan un desbalance de los mecanismos reguladores o los mecanismos responsables de los procesos metabólicos (Vicennati, Genghini, De, Pasqui, Pagotto, & Pasquali 2007). Llama la atención que en nuestros datos había una

correlación positiva significativa entre la obestatina y pérdida de perímetro abdominal a los dos años de seguimiento, indicando que la obestatina puede tener una cierta influencia sobre la adiposidad central, al menos en las mujeres.

De hecho, se ha demostrado que la obestatina tendría un efecto a nivel de los adipocitos con una acción proadipogénica (Gurriaran-Rodriguez et al 2011). Por lo tanto, se podría especular que la pérdida de peso y la anorexia en los ancianos puede inducir un aumento en la obestatina como fenómeno contrarregulador y potencialmente protector. Por otra parte, la asociación de niveles altos de obestatina en individuos con una mala situación nutricional se podría explicar por una pérdida de efecto de la obestatina. De hecho, esta condición de "pérdida de efecto" de ciertos neuromediadores, que es una condición relacionada con el envejecimiento observado en diferentes sistemas fisiológicos, se pueden aplicar no sólo para la obestatina sino también para la ghrelina en los ancianos. En este sentido, no hemos encontrado una asociación con el hambre o el apetito y los niveles de ghrelina en las mujeres ancianas, lo que corroboraría este efecto de la edad sobre la modificación en las percepciones relacionadas con la ingesta mediada por los productos del gen de la ghrelina.

Sin embargo, los datos existentes hasta la actualidad en relación al papel de la obestatina en la ingesta de alimentos y el peso corporal son bastante contradictorios y difíciles de interpretar. Se han propuesto varias explicaciones para estos datos contradictorios: las diferencias en el modo de administración de obestatina en diseños experimentales, el hecho de que la obestatina parece carecer de permeabilidad en la BHE (Pan et al 2006) y la corta vida media de obestatina que podría explicar por qué algunos investigadores no pueden observar estas acciones in vivo (Zhang, Ren, vsian-Kretchmer, Luo, Rauch, Klein, & Hsueh 2005). Lagaud et al sugirió un fenómeno dosis-respuesta en forma de U para la acción de la obestatina (Lagaud et al 2007), y que la porción N-terminal de la obestatina (residuos 1-13) reduciría la ingesta y el peso corporal, efectos no mediados por las porciones media y C-terminal del péptido (Nagaraj, Peddha, & Manjappara 2008); también se ha sugerido que la existencia de diferentes niveles de pureza en obestatina obtenida por distintos proveedores (De et al 2008) podría explicar también estos datos controvertidos relacionados con sus efectos. Varios estudios han planteado la hipótesis de que una expresión reducida del gen de la ghrelina conduce a una disminución tanto de la ghrelina como de la obestatina en la obesidad, de forma desadaptativa, que perpetuarían el estado de obesidad (Huda, Durham, Wong, Deepak,

Kerrigan, McCulloch, Ranganath, Pinkney, & Wilding 2008). Nuestros resultados podrían parcialmente explicarse en este sentido por la alta prevalencia de obesidad y SM en nuestra muestra.

Nuestros datos sugieren un papel recíproco con un efecto opuesto de la ghrelina y la obestatina en el SM, donde la ghrelina se asociaría a un perfil metabólico más favorable y la obestatina a un perfil metabólico más desfavorable. Al categorizar por cuartiles tanto la ghrelina como la obestatina, observamos que los niveles altos de ghrelina (cuarto cuartil) se asociaban a menor prevalencia de hipertrigliceridemia, HDL bajo, obesidad central y SM; por otro lado, los niveles altos de obestatina (cuarto cuartil) se asociaban a mayor prevalencia de glucosa patológica y de SM. La correlación de los niveles de ghrelina y obestatina también apuntan a una regulación común de ambos productos génicos y la asociación de la ghrelina y la obestatina con parámetros de SM es consecuentemente interesante y confirmaría el papel de los productos génicos de la ghrelina en la regulación del metabolismo. Vicennati et al (Vicennati, Genghini, De, Pasqui, Pagotto, & Pasquali 2007) también ha reportado que la obestatina se correlaciona con algunos componentes del SM; estos investigadores encontraron que la obestatina se correlaciona positivamente con el colesterol total y los triglicéridos y el ratio de ghrelina/obestatina negativamente con el perímetro de cintura. También hallaron una correlación negativa con el HOMA y la insulina, señalando también a un papel en la regulación del equilibrio metabólico. En nuestro estudio, la glucosa presenta valores más altos en aquellos sujetos en el cuartil más alto de obestatina, así como la presencia de SM. También hemos encontrado niveles más altos de ghrelina y del ratio ghrelina / obestatina en el cuartil más bajo de la insulina y HOMA, lo que apunta a una correlación negativa con resistencia a la insulina, y en similitud a otros datos descritos (Vicennati, Genghini, De, Pasqui, Pagotto, & Pasquali 2007), pero no observamos asociación con los niveles de obestatina. Por el contrario, en el estudio de Nakahara et al (Monteleone, Serritella, Martiadis, Scognamiglio, & Maj 2008; Nakahara, Harada, Yasuhara, Shimada, Amitani, Sakoguchi, Kamiji, Asakawa, & Inui 2008) se observó una correlación negativa de la insulina y HOMA, tanto con acil-ghrelina, desacil-ghrelina y obestatina y el estudio de Anderwald-Stadler et al (Anderwald-Stadler, Krebs, Promintzer, Mandl, Bischof, Nowotny, Kastenbauer, Luger, Prager, & Anderwald 2007) mostró que la infusión de insulina reduce los niveles de obestatina en los insulín-sensibles pero no en los insulín-resistentes. Por otra parte, un estudio en páncreas de rata perinatal ha mostrado una correlación positiva entre la insulina y obestatina,

lo que sugiere un posible papel de la obestatina en el control de la secreción de insulina (Chanoine et al 2006).

Dada la asociación entre la ghrelina y la obestatina y la conocida asociación entre la ghrelina y el eje somatotropo, resulta interesante conocer el papel que la obestatina puede tener sobre dicho eje. Estudios previos de nuestro grupo han valorado la asociación entre niveles de IGF-I y ghrelina y la asociación positiva entre niveles de ghrelina y fuerza muscular, y entre disminución de ghrelina y pérdida de capacidad funcional (Serra-Prat, Palomera, Roca, & Puig-Domingo 2010). Además, estudios recientes han mostrado que la obestatina modula la acción de la ghrelina revirtiendo su efecto en las neuronas hipotalámicas GHRH (Feng, Yang, Loudes, Simon, Al-Sarraf, Culler, vejar-Perez, Llorens-Cortes, Chen, Epelbaum, & Gardette 2011). Con estos antecedentes, estudiamos el papel de la obestatina en la capacidad funcional de nuestra cohorte. Observamos una relación inversa entre ambas variables, de tal forma que la fuerza muscular de la mano no dominante disminuye en relación a niveles más altos de obestatina, tanto en la valoración inicial como a los 2 años de seguimiento, independientemente de los niveles de IGF-I; ninguna de las mujeres estudiadas con baja fuerza muscular de la mano o con algún componente de fragilidad tenía niveles de obestatina en el primer cuartil. Asimismo, observamos un mayor deterioro de la función cognitiva y de la capacidad funcional, evaluados por MiniExamen Cognoscitivo (MEC) y Barthel respectivamente, en las mujeres que se encontraban en el cuarto cuartil de obestatina. Sin embargo, no hemos encontrado asociación entre los niveles de obestatina y el desarrollo de fragilidad en su concepto clásico. Estos datos sugieren que la obestatina se comportaría como un marcador biológico de pérdida de la salud en el tiempo en las mujeres mayores de 70 años, por lo menos en nuestra población, y entre otros biomarcadores. Hasta la fecha no existen estudios previos que describan el papel de la obestatina en la fuerza muscular, capacidad funcional y mental y desarrollo de fragilidad.

La ghrelina ha de ser considerada como una hormona anabólica por su capacidad para estimular el eje somatotropo y para estimular el comportamiento orexigénico. En principio, estas acciones se han atribuido a la forma activa de la molécula, la acil-ghrelina, que es la única isoforma de la ghrelina para estimular el receptor GHS-R1a, mientras que la desacil-ghrelina, la isoforma más abundante de la ghrelina circulante, no actúa sobre este receptor (Andrews 2011; Liu, Garcia, & Korbonits 2011). En virtud de estos efectos, nuestro grupo mostró que los individuos con niveles circulantes superiores de ghrelina presentaban una mayor fuerza

muscular de la mano con el envejecimiento (Serra-Prat, Palomera, Roca, & Puig-Domingo 2010). Sin embargo, los mecanismos por los que la ghrelina puede influir en la función muscular no sólo están relacionados con una acción endocrina mediada por la GH. Recientemente se ha descrito que la ghrelina, tanto la forma acil como la desacil, pueden actuar en el músculo nivel a través de mecanismos directos que no implican el receptor GHS-R1a, el cual no está presente en los miocitos (Baldanzi, Filigheddu, Cutrupi, Catapano, Bonissoni, Fubini, Malan, Baj, Granata, Broglio, Papotti, Surico, Bussolino, Isgaard, Deghenghi, Sinigaglia, Prat, Muccioli, Ghigo, & Graziani 2002; Gnanapavan et al 2002; Filigheddu, Gnocchi, Coscia, Cappelli, Porporato, Taulli, Traini, Baldanzi, Chianale, Cutrupi, Arnoletti, Ghe, Fubini, Surico, Sinigaglia, Ponzetto, Muccioli, Crepaldi, & Graziani 2007; Sheriff, Kadeer, Joshi, Friend, James, & Balasubramaniam 2012). Filigheddu et al. (Filigheddu, Gnocchi, Coscia, Cappelli, Porporato, Taulli, Traini, Baldanzi, Chianale, Cutrupi, Arnoletti, Ghe, Fubini, Surico, Sinigaglia, Ponzetto, Muccioli, Crepaldi, & Graziani 2007) han demostrado que tanto acil-ghrelina como la desacil-ghrelina estimulan la fosforilación de varias proteínas musculares y activan ERK-1/2 y Akt, lo que indica que tanto la dos isoformas de la ghrelina pueden ejercer una actividad biológica en las células musculares. Estos resultados sugieren que estas acciones a nivel muscular están mediadas posiblemente por un receptor aún no identificado, común para ambas isoformas y diferente a GHS-R1a, que compartirían varios tipos celulares, incluyendo la línea celular de los cardiomiocitos (Baldanzi, Filigheddu, Cutrupi, Catapano, Bonissoni, Fubini, Malan, Baj, Granata, Broglio, Papotti, Surico, Bussolino, Isgaard, Deghenghi, Sinigaglia, Prat, Muccioli, Ghigo, & Graziani 2002).

Los datos que hemos obtenido hasta ahora del Estudio de Envejecimiento de Mataró indican que los individuos con niveles de ghrelina circulante más altos pueden tener mejor capacidad funcional reflejada e influida por una mejor fuerza muscular (Serra-Prat, Palomera, Roca, & Puig-Domingo 2010); por el contrario, las mujeres con altos niveles de obestatina fueron las que presentaron menor fuerza muscular en las manos, todo lo cual apuntaría hacia las acciones opuestas entre obestatina y ghrelina, al menos respecto a la fuerza muscular. Todavía se desconoce si la obestatina actuaría directamente sobre el miocito o su actividad se produciría a través de la modulación de los efectos de ghrelina en el miocito. Esto último parece más plausible ya que todos los datos publicados sobre la fisiología de la obestatina indican que la obestatina es más un regulador de la ghrelina en lugar de un péptido con verdaderas propiedades hormonales (Garg 2007).

Esta asociación perjudicial de la obestatina en relación a la función muscular -cuya causalidad está pendiente de explorar- expresa cómo la disminución de la fuerza en los individuos en el cuartil más alto de la obestatina es similar a otras funciones propias del envejecimiento, como queda reflejado con los datos de función cognitiva y capacidad funcional que hemos observado en nuestra cohorte. Se conoce poco cuál es el papel de la obestatina en la cognición, a diferencia de lo que sucede con la ghrelina donde hay más información disponible (Frago et al 2011). Estudios experimentales en ratas han demostrado el papel neuroprotector de la ghrelina (Carlini, Monzon, Varas, Cragolini, Schioth, Scimonelli, & de, Sr. 2002; Carlini et al 2004), pero también de la obestatina (Carlini, Schioth, & Debarioglio 2007). En humanos, el único estudio publicado hasta la fecha en los ancianos mostró una correlación negativa entre la ghrelina y los dominios cognitivos, lo contrario de lo que se encontró en los estudios experimentales (Spitznagel et al 2010). Nuestros datos muestran resultados similares en relación con la obestatina, donde las mujeres en el cuartil más alto de obestatina tendrían una mayor pérdida en el MEC.

No está claro el papel de los productos del gen de la ghrelina en sujetos de menor edad en relación a capacidad funcional, por lo que sería interesante, y de hecho habrá que realizar más estudios para clarificar el papel del binomio ghrelina/obestatina en la fuerza muscular, la capacidad funcional y la memoria. Una explicación plausible sería que la pérdida de la acción de ghrelina en los ancianos daría lugar a un incremento neto en la modulación negativa de obestatina sobre los efectos de la ghrelina favoreciendo el proceso de envejecimiento o debidos a él; sin embargo, esta posibilidad, así como otras interpretaciones, son muy especulativas en la actualidad. Por último, aunque una participación causal del binomio ghrelina/obestatina en el desarrollo de la condición de fragilidad sería una posibilidad atractiva, todos estos hallazgos pueden corresponder sólo a epifenómenos del proceso de envejecimiento en sí. Igualmente, otros marcadores biológicos asociados al envejecimiento, probablemente incluso más potentes que la ghrelina/obestatina, también se han confirmado en nuestro estudio; específicamente, los bajos niveles de IGF-I identifican de forma bastante robusta a los sujetos en riesgo de deterioro funcional y mental, así como aquellos con un deterioro de la fuerza muscular en el seguimiento.

Con todos estos datos, parecería que mientras la ghrelina se asociaría con un perfil metabólico más favorable y podría tener un papel anti-fragilidad favoreciendo la fuerza muscular, la

obestatina se asociaría con un perfil metabólico más desfavorable y tendría un papel pro-fragilidad asociada a una menor fuerza muscular. Sin embargo, esta interpretación de nuestros resultados requerirá de más estudios para explicar esta asociación y el papel de los dos péptidos en este proceso.

6.ASOCIACIÓN ENTRE LOS MARCADORES METABÓLICOS Y HORMONALES Y LA SUPERVIVENCIA.

Nuestro trabajo ha incluido la descripción de los parámetros metabólicos y hormonales asociados a la mortalidad en ancianos de más de 70 años no institucionalizados pertenecientes al Estudio de Envejecimiento de Mataró y su análisis en clave multifactorial. En relación a los parámetros metabólicos no encontramos asociación de supervivencia con los componentes del SM, y tampoco del SM como tal y supervivencia. Muchos o casi todos los estudios recientes muestran una asociación entre SM y mortalidad de causa CV y global, en población general que cubre un amplio rango de edad (Ford 2005;Galassi et al 2006;Gami et al 2007;Mottillo et al 2010). Sin embargo, la mayoría de estudios hechos en ancianos no muestran dicha asociación. En estudios italianos no se vio asociación con mortalidad global (Ravaglia, Forti, Maioli, Bastagli, Chiappelli, Montesi, Bolondi, & Patterson 2006) y otros dos, uno en sujetos finlandeses (Wang, Ruotsalainen, Moilanen, Lepisto, Laakso, & Kuusisto 2007a) y otro en chinos (Sun et al 2012) sí que se vio asociación con mortalidad CV. En el Progetto Veneto Anziani Study (Zambon, Zanoni, Romanato, Corti, Noale, Sartori, Musacchio, Baggio, Crepaldi, & Manzato 2009) se vio que el SM se asociaba a mayor mortalidad CV tanto en hombres como mujeres, y que en relación a los componentes de SM, la glucosa alta en la muestra global y el HDL bajo en las mujeres era predictor de mortalidad global. En nuestro estudio al categorizar el perímetro de cintura en cuartiles y por sexo, los participantes que se encontraban en el primer y cuarto cuartil tenían una mayor mortalidad, pero con una asociación en forma de U, de modo que los varones con un perímetro de cintura entre 98 y 102 cm y las mujeres entre 95 y 102 cm tenían una menor mortalidad que el resto. Por el contrario, con los puntos de corte habituales de obesidad central definidos por los criterios de IDF y ATP-III no hallamos ninguna asociación significativa. El punto de corte específico de perímetro de cintura ha sido una cuestión de debate y controversia, con poca información consistente para su aplicación en ancianos. Nuestros datos indicarían que estos puntos de corte entre 98-102 cm en varones y 95-102 cm en mujeres se asociarían a un efecto protector

en términos de mortalidad y que los criterios de IDF y ATP-III clásicamente usados serían poco útiles en los ancianos. Lo mismo se podría aplicar para la definición de SM, condición que en los ancianos de > 75 años quizá se debería redefinir o eliminar en la práctica clínica. En relación a nuestros datos, otros estudios también han mostrado esta asociación en forma de U entre el perímetro de cintura y la mortalidad (Carmienke et al 2013), o en J (de Hollander et al 2012), mientras que otros han hallado una asociación más lineal (Zhang et al 2008). Sin embargo, estos estudios generalmente se han realizado en poblaciones con un rango de edad más amplio en el que no sólo se incluían participantes de >75 años, lo cual limita las predicciones para los ancianos, que generalmente no se encuentran suficientemente representados en estos estudios. También se han usado otras variables antropométricas como el perímetro de la cadera o el ratio cintura/cadera para valorar su asociación con la mortalidad (Cameron et al 2013), pero en nuestra muestra tampoco encontramos ninguna asociación con mortalidad a los 8 años de seguimiento. En estudios recientes se remarca la importancia de mantener un buen perímetro de cintura y un buen IMC en individuos jóvenes afectados de diabetes (Katzmarzyk et al 2013), sin embargo, tampoco encontramos en nuestra cohorte de diabéticos una asociación entre la obesidad central y mortalidad, aunque en nuestra serie estos resultados negativos podrían estar influidos por el tamaño de la muestra de diabéticos y a un sesgo de supervivencia. Los estudios realizados en sujetos ancianos supervivientes tras > 10 años de seguimiento demuestran que este subgrupo suele escapar a las ECV o retrasarlas hasta el punto de que el concepto clásico de SM no identifica una situación de riesgo especial (Evert et al 2003; Schoenhofen et al 2006).

Desde el punto de vista hormonal, vimos que en nuestra cohorte la mortalidad se relacionó fundamentalmente con los esteroides gonadales y adrenales, pero también con el eje somatotropo. En la muestra global, la DHEA se asoció a mayor supervivencia, mientras que el cortisol, el ratio cortisol/DHEA y la estrona a menor supervivencia. Por sexos, en varones, los niveles de IGF-I, estrona, cortisol/DHEA y cortisol/DHEAs presentan concentraciones menores en los supervivientes, mientras que en mujeres, los niveles de GH y ghrelina eran más elevadas en las supervivientes y los de cortisol/DHEAs eran menores. En relación a las hormonas gonadales, la estrona se asoció a menor supervivencia en la muestra completa, tanto en hombres como en mujeres. Un estudio reciente (Hsu et al 2014) ha visto que los niveles bajos de estrona se asocian a peor salud en varones ancianos, pero no hay datos sobre supervivencia. En mujeres postmenopáusicas con enfermedad CV conocida y por lo tanto con factores de riesgo que presentan niveles bajos de estrona, se ha visto que tienen mayor

mortalidad (de Padua et al 2012). Por otro lado, en nuestra cohorte no vimos asociación con la testosterona ni con el estradiol. Aunque los niveles bajos de testosterona se han asociado a obesidad abdominal (Derby et al 2006), a factores de riesgo CV y SM (Muller et al 2005), a diabetes mellitus 2 (Ding et al 2006), así como a dislipemia y a aumento de marcadores inflamatorios, en relación a la mortalidad sólo se han publicado resultados controvertidos, con un bajo grado de asociación con la mortalidad global, y aún menos con la mortalidad CV (Araujo, Dixon, Suarez, Murad, Guey, & Wittert 2011).

Considerando el eje adrenal en nuestro estudio, al categorizar por cuartiles existe una tendencia a la significación para el cortisol (asociación lineal), DHEA (en forma de U) y el ratio cortisol/DHEA, pero no hay asociación con la DHEAs ni el ratio cortisol/DHEAs. En varones, la mortalidad muestra una tendencia para el cortisol, ratio cortisol/DHEA y asociación con cortisol/DHEAs, mientras que en mujeres la asociación se observa con DHEA y ratio cortisol/DHEA. Esto enlaza con nuestros resultados previos en los que hallamos una asociación entre la DHEA y la testosterona y el desarrollo de fragilidad en hombres. Las concentraciones de DHEA y DHEAs y su asociación con la mortalidad en las personas mayores es un tema controvertido. En el Swedish Men Study (Ohlsson, Labrie, Barrett-Connor, Karlsson, Ljunggren, Vandenput, Mellstrom, & Tivesten 2010) y en otro estudio (Kahonen, Tilvis, Jolkkonen, Pitkala, & Harkonen 2000), los niveles bajos tanto de DHEA y DHEAs fueron predictores de una mayor mortalidad sólo en los individuos de menos de 75 años de edad, pero no en los mayores, mientras que otros dos estudios han mostrado una asociación entre niveles bajos de DHEAs y aumento de la mortalidad en ancianos (Trivedi & Khaw 2001;Maggio et al 2007), y finalmente, otros seis estudios prospectivos indican una asociación entre niveles más bajos de DHEAs y la progresión de la enfermedad aterosclerótica, tanto en hombres y mujeres (Herrington, Gordon, Achuff, Trejo, Weisman, Kwiterovich, Jr., & Pearson 1990;Bernini, Sgro', Moretti, Argenio, Barlascini, Cristofani, & Salvetti 1999), pero sin demostrar una asociación con la mortalidad en mujeres (Barrett-Connor & Goodman-Gruen 1995a;Trivedi & Khaw 2001;Tchernof & Labrie 2004) y hombres (Legrain, Berr, Frenoy, Gourlet, Debuire, & Baulieu 1995;Kahonen, Tilvis, Jolkkonen, Pitkala, & Harkonen 2000). En cuanto a la asociación entre la DHEA, así como el de la DHEAs, y mortalidad, se ha sugerido que podría deberse a su efecto biológico directo, a través de acciones de estimulación sobre PPAR, entre otros, y también modulando la función inmune, protegiendo contra el estrés oxidativo y el desarrollo de aterosclerosis (Poynter & Daynes 1998). Sin embargo, no encontramos asociación entre DHEAs y mortalidad en nuestra muestra, pero sí una asociación positiva con el ratio

cortisol/DHEAs. En el Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) se vio que en mujeres postmenopáusicas con factores de riesgo coronario que se sometían a angiografía por sospecha de isquemia miocárdica, los niveles bajos de DHEAs se asociaban a mayor mortalidad CV y de todas las causas (Shufelt, Bretsky, Almeida, Johnson, Shaw, Azziz, Braunstein, Pepine, Bittner, Vido, Stanczyk, & Bairey Merz 2010). Para añadir controversia a la cuestión, un estudio reciente (Haring et al 2013) en ancianos no dependientes no encontró asociación entre mortalidad de todas las causas con los esteroides sexuales.

En nuestra cohorte también hemos observado una asociación significativa entre los niveles bajos de GH y ghrelina y la mortalidad. Se ha visto que el proceso de envejecimiento tanto saludable como no saludable está relacionado con el eje somatotropo, afectando a la longevidad y la supervivencia, con una relación en forma de U (Brugts, van den Beld, Hofland, van der, van Koetsveld, Frystyk, Lamberts, & Janssen 2008). Niveles bajos de IGF-I se han asociado a fragilidad en ancianos y a distintos grados de discapacidad y mortalidad prematura (Cappola, Xue, Ferrucci, Guralnik, Volpato, & Fried 2003) y mortalidad CV (Laughlin, Barrett-Connor, Criqui, & Kritz-Silverstein 2004). Hay que tener en cuenta sin embargo, que los niveles de IGF-I pueden ser un buen reflejo de la secreción de GH en adultos jóvenes bien nutridos, mientras que en los ancianos los niveles de IGF-I están modulados también por factores no relacionados con la GH como el estado nutricional, la obesidad, los esteroides sexuales y la acción de la insulina, y todos ellos y particularmente el estado nutricional son muy relevantes. Datos previos de nuestro grupo han demostrado el papel potencial de la ghrelina en el desarrollo de fragilidad en los ancianos (Serra-Prat, Fernandez, Burdoy, Mussoll, Casamitjana, & Puig-Domingo 2007; Serra-Prat, Palomera, Roca, & Puig-Domingo 2010). Hasta donde sabemos estos son los primeros datos que relacionan la ghrelina con la mortalidad en mujeres.

Debido a los ajustes secuenciales en los análisis estadísticos de nuestro estudio, con los scores de Barthel, Lawton, el MCE y el MNA, el poder estadístico de la muestra se fue debilitando como es esperable, a medida que se añadían al análisis más factores de confusión. Sin embargo se sabe que el MNA y el MEC se relacionan con la mortalidad pero también están fuertemente asociados con factores hormonales, por lo que su inclusión como factores de confusión puede diluir la significación estadística de las asociaciones observadas e incluso puede llevar a algún tipo de colinealidad. Adicionalmente, aunque la puntuación del índice de Lawton se incluyó en el análisis, vale la pena recordar que en los hombres de esta cohorte en

particular, puede que no sea muy informativo del verdadero grado de funcionalismo en relación a sus habilidades de instrumentalización y por lo tanto sea poco fiable, debido al hecho de que muchos de estos hombres nunca llegaron a adquirir algunos papeles en su vida social debido a razones culturales por un claro sesgo de género.

En resumen, en nuestra cohorte de ancianos no dependientes del Estudio de Envejecimiento de Mataró, encontramos una asociación en U entre el perímetro de cintura y la mortalidad, así como también una asociación con parámetros hormonales, entre los que cabe destacar a los esteroides adrenales (DHEA y cortisol fundamentalmente) y gonadales (estrón), y el eje somatotropo (GH y ghrelina).

Hay que considerar finalmente que las asociaciones que hemos encontrado son débiles, lo que nos sugiere que cada uno de los factores estudiados podrían jugar un pequeño papel en la complejidad del proceso de envejecimiento, donde ninguno de los factores sería obviamente un determinante único en el proceso sino uno más de una constelación interrelacionada de factores, biológicos unos y no biológicos otros.

7.DIFICULTADES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones que debemos mencionar. Por un lado, aunque se trata de un estudio de base poblacional en ancianos no institucionalizados, la inclusión de individuos más jóvenes hubiera evitado el problema de sobrerrepresentación de determinados genotipos debido a un sesgo de supervivencia. El número de individuos reclutado estuvo limitado por las posibilidades de reclutamiento de las áreas geográficas específicas involucradas en el estudio. Un número superior de participantes habría permitido un mayor poder estadístico, como es obvio, pero el grado de respuesta al contactar con los potenciales participantes, aún no siendo bajo, condicionó la captura final y un número concreto de sujetos incluidos. En este sentido, en los estudios de polimorfismos, el tamaño de la muestra ha podido condicionar una cierta falta de poder estadístico por una baja frecuencia de determinados polimorfismos, por lo que es posible que no hayamos encontrado todas las posibles asociaciones. Por ello, incluimos población de otro estudio, el estudio Río Hortega de

Valladolid, con un fenotipo y edad muy similares, y por tanto, adecuado para el análisis conjunto. Por otro lado, la determinación de la acil-ghrelina además de la ghrelina total habría podido ayudar a explicar algunas asociaciones potenciales no encontradas en nuestra cohorte. También tenemos que considerar que entre nuestros sujetos había una alta prevalencia de SM y de obesidad central por criterios de IDF o ATP-III, lo cual ha podido contribuir también a un sesgo, aunque desde un punto de vista epidemiológico, ésta es la realidad de nuestra población mayor autónoma.

Entre las limitaciones también hay que considerar, de manera específica para cada uno de los estudios, que en aquellos en los que se ha valorado la función cognitiva, el MMSE y el MEC son herramientas fundamentalmente de cribado, siendo en este sentido de una gran utilidad y valor demostrados, pero que para una más fina caracterización de la función cognitiva son necesarios test neuropsicológicos mucho más complejos y largos en cuanto a su ejecución que superan las posibilidades organizativas, logísticas y financieras del Estudio de Envejecimiento de Mataró. En relación al estudio de la obestatina en nuestra cohorte, hay que considerar que se ha realizado sólo en mujeres, por lo que los resultados no se pueden obviamente extrapolar a varones. Asimismo, la determinación de obestatina amilada en lugar de la obestatina total podría haber ayudado a hacer un estudio más completo y a explicar asociaciones no encontradas en nuestro estudio.

Sin embargo, nuestro estudio también tiene aspectos positivos. Por un lado, se trata de una muestra homogénea obtenida de un área geográfica específica, con situación cultural también muy homogénea, lo que garantiza un estilo de vida similar en los individuos durante la mayor parte de su vida y por lo tanto es poco dispersa en relación a ciertas variables de confusión más difíciles de medir. Además la caracterización fenotípica de nuestros sujetos es bastante extensa.

VI. CONCLUSIONES

En relación a los distintos objetivos, podemos exponer las siguientes conclusiones:

1) Determinar el posible papel de los ejes somatotropo, gonadal y adrenal en la capacidad funcional y el desarrollo de fragilidad en nuestra población de estudio.

El eje somatotropo, gonadal y adrenal juegan un papel en el estado de salud, el envejecimiento y el desarrollo de fragilidad, especialmente el eje adrenal en las mujeres y los ejes somatotropo y gonadal en los varones.

- a. El estradiol en relación al MNA, la testosterona con el índice Barthel y el MMSE, y la DHEA en relación al MMSE.
- b. El desarrollo de fragilidad se asocia con niveles inferiores de testosterona, pero sólo en varones.

2) Determinar la frecuencia de los 6 polimorfismos más frecuentes para el gen de Ghrelina (-994CTrs26312, -604GA rs27647, 501AC rs26802, Arg51Gln, Leu72Met y Gln90Leu), la variante alélica de 192 pb del promotor del gen de IGF-I y del polimorfismo ER22/23EK del gen del receptor de GC.

La prevalencia de los distintos polimorfismos es parecido al descrito en otras poblaciones, salvo en el caso del polimorfismo ER22/23EK del gen del receptor de GC, que es algo inferior en nuestra muestra.

3) Evaluar la potencial asociación entre las mencionadas variantes alélicas y la fuerza muscular, capacidad funcional, estado mental y nutricional, y la presencia de los distintos componentes del SM.

Existe una asociación entre las distintas variantes alélicas de los distintos genes estudiados y los componentes del SM, así como con la capacidad funcional:

- a. Los homocigotos para el 192 pb del promotor del gen de IGF-I tienen una mejor condición de envejecimiento, con menor prevalencia en alteraciones metabólicas y un mejor estado mental, nutricional y funcional.
- b. Los portadores de ER22/23EK presentaban una menor prevalencia de HTA, pero no hay asociación con el resto de criterios SM, MMSE, Barthel ni MNA.
- c. Los polimorfismos de la ghrelina, especialmente -604GA, -501AC y M72L, se asocian con ciertos componentes del SM, especialmente con la obesidad central, el IMC y el perfil lipídico.
- d. El polimorfismo L90G se asocia a la función cognitiva.

4) Estudiar el papel de la obestatina en el estado nutricional, hambre, riesgo de SM y deterioro funcional en la muestra poblacional del estudio de envejecimiento de Mataró.

La obestatina está elevada en las mujeres ancianas con el SM y:

- a. Parece estar asociada a cambios en el perímetro de cintura, lo que apunta a un papel de la obestatina en la obesidad. Sin embargo, no se asocia a parámetros nutricionales, pérdida de peso ni anorexia.
- b. Se asocia a menor fuerza muscular, peor capacidad funcional y estado cognitivo.

5) Determinar si alguno de los marcadores metabólicos y hormonales se asocia a una mayor tasa de supervivencia en el estudio longitudinal.

En relación a la supervivencia:

- a. El perímetro de cintura se asocia con la supervivencia en forma de U, lo que sugiere el limitado papel de los criterios IDF y ATP-III en la caracterización del riesgo CV en los ancianos.
- b. Los factores hormonales (esteroides adrenales y eje somatotropo) influyen en la supervivencia en los participantes en el Estudio de Envejecimiento de Mataró.

Así pues, el proceso de envejecimiento es un proceso fisiológico que lleva a distintas situaciones de pérdida de función, a un deterioro de las capacidades funcionales y a un deterioro de la calidad de vida en los ancianos que se ve influido por los ejes hormonales y parámetros metabólicos y que estos factores actuarán en diferente medida en cada uno de los individuos propiciando el proceso de envejecimiento. Los factores genéticos con la presencia de distintas variantes polimórficas que influyen en los factores hormonales, también pueden ejercer un papel en el proceso de envejecimiento. En nuestro estudio hemos encontrado distintas asociaciones, la mayoría de ellas débiles, lo que nos sugiere que cada uno de los factores estudiados, podrían jugar un pequeño papel en la complejidad del proceso de envejecimiento, donde ninguno de los factores sería obviamente un determinante único en el proceso sino uno más de una constelación interrelacionada de factores, biológicos unos y no biológicos otros.

VII. BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS

- Aberg,N.D., Brywe,K.G., & Isgaard,J. (2006) Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal*. **6**, 53-80.
- Akbaraly,T.N., Kivimaki,M., Shipley,M.J., Tabak,A.G., Jokela,M., Virtanen,M., Marmot,M.G., Ferrie,J.E., & Singh-Manoux,A. (2010) Metabolic syndrome over 10 years and cognitive functioning in late midlife: the Whitehall II study. *Diabetes Care* **33**, 84-89.
- Albani,D., Batelli,S., Polito,L., Vittori,A., Pesaresi,M., Gajo,G.B., De,A.S., Zanardo,A., Gallucci,M., & Forloni,G. (2009) A polymorphic variant of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor correlates with male longevity in the Italian population: a genetic study and evaluation of circulating IGF-1 from the "Treviso Longeva (TRELONG)" study. *BMC.Geriatr*. **9**, 19.
- Aleman,A. & Torres-Aleman,I. (2009) Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan. *Prog.Neurobiol*. **89**, 256-265.
- Aleman,A., Verhaar,H.J., De Haan,E.H., De Vries,W.R., Samson,M.M., Drent,M.L., Van,d., V, & Koppeschaar,H.P. (1999) Insulin-like growth factor-I and cognitive function in healthy older men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84**, 471-475.
- Allen,N.E., Davey,G.K., Key,T.J., Zhang,S., & Narod,S.A. (2002) Serum insulin-like growth factor I (IGF-I) concentration in men is not associated with the cytosine-adenosine repeat polymorphism of the IGF-I gene. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*. **11**, 319-320.
- Amore,M. (2005) Partial androgen deficiency and neuropsychiatric symptoms in aging men. *J.Endocrinol.Invest* **28**, 49-54.
- Ando,T., Ichimaru,Y., Konjiki,F., Shoji,M., & Komaki,G. (2007) Variations in the preproghrelin gene correlate with higher body mass index, fat mass, and body dissatisfaction in young Japanese women. *Am.J.Clin.Nutr*. **86**, 25-32.
- Andrews,Z.B. (2011) The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function 12. *Trends Neurosci*. **34**, 31-40.
- Araujo,A.B., Dixon,J.M., Suarez,E.A., Murad,M.H., Guey,L.T., & Wittert,G.A. (2011) Clinical review: Endogenous testosterone and mortality in men: a systematic review and meta-analysis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **96**, 3007-3019.
- Ariyasu,H., Takaya,K., Iwakura,H., Hosoda,H., Akamizu,T., Arai,Y., Kangawa,K., & Nakao,K. (2005) Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology* **146**, 355-364.

- Armanios,M., Alder,J.K., Parry,E.M., Karim,B., Strong,M.A., & Greider,C.W. (2009) Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am.J.Hum.Genet.* **85**, 823-832.
- Arnlov,J., Pencina,M.J., Amin,S., Nam,B.H., Benjamin,E.J., Murabito,J.M., Wang,T.J., Knapp,P.E., D'Agostino,R.B., Sr., Bhasin,S., & Vasan,R.S. (2006) Endogenous sex hormones and cardiovascular disease incidence in men. *Ann.Intern.Med.* **145**, 176-184.
- Atalayer,D. & Astbury,N.M. (2013) Anorexia of aging and gut hormones. *Aging Dis.* **4**, 264-275.
- Baldanzi,G., Filigheddu,N., Cutrupi,S., Catapano,F., Bonisconi,S., Fubini,A., Malan,D., Baj,G., Granata,R., Broglio,F., Papotti,M., Surico,N., Bussolino,F., Isgaard,J., Deghenghi,R., Sinigaglia,F., Prat,M., Muccioli,G., Ghigo,E., & Graziani,A. (2002) Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT 11. *J.Cell Biol.* **159**, 1029-1037.
- Barazzoni,R., Zanetti,M., Ferreira,C., Vinci,P., Pirulli,A., Mucci,M., Dore,F., Fonda,M., Ciochi,B., Cattin,L., & Guarnieri,G. (2007) Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **92**, 3935-3940.
- Barbieri,M., Ferrucci,L., Ragno,E., Corsi,A., Bandinelli,S., Bonafe,M., Olivieri,F., Giovagnetti,S., Franceschi,C., Guralnik,J.M., & Paolisso,G. (2003) Chronic inflammation and the effect of IGF-I on muscle strength and power in older persons. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **284**, E481-E487.
- Barbieri,M., Gambardella,A., Paolisso,G., & Varricchio,M. (2008) Metabolic aspects of the extreme longevity. *Exp.Gerontol.* **43**, 74-78.
- Barrett-Connor,E. & Edelstein,S.L. (1994) A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate and cognitive function in an older population: the Rancho Bernardo Study. *J.Am.Geriatr.Soc.* **42**, 420-423.
- Barrett-Connor,E. & Goodman-Gruen,D. (1995a) Dehydroepiandrosterone sulfate does not predict cardiovascular death in postmenopausal women. The Rancho Bernardo Study. *Circulation* **91**, 1757-1760.
- Barrett-Connor,E. & Goodman-Gruen,D. (1995b) The epidemiology of DHEAS and cardiovascular disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **774**, 259-270.
- Barrett-Connor,E. & Khaw,K.T. (1987) Absence of an inverse relation of dehydroepiandrosterone sulfate with cardiovascular mortality in postmenopausal women. *N.Engl.J.Med.* **317**, 711.
- Barrett-Connor,E. & Khaw,K.T. (1988) Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. A prospective population-based study. *Circulation* **78**, 539-545.

Barrett-Connor,E., Khaw,K.T., & Yen,S.S. (1986) A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality, and cardiovascular disease. *N.Engl.J.Med.* **315**, 1519-1524.

Barrett-Connor,E., Von Muhlen,D.G., & Kritz-Silverstein,D. (1999a) Bioavailable testosterone and depressed mood in older men: the Rancho Bernardo Study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84**, 573-577.

Barrett-Connor,E., Von,M.D., Laughlin,G.A., & Kripke,A. (1999b) Endogenous levels of dehydroepiandrosterone sulfate, but not other sex hormones, are associated with depressed mood in older women: the Rancho Bernardo Study. *J.Am.Geriatr.Soc.* **47**, 685-691.

Barzilai,N., Huffman,D.M., Muzumdar,R.H., & Bartke,A. (2012) The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* **61**, 1315-1322.

Basar,M.M., Aydin,G., Mert,H.C., Keles,I., Caglayan,O., Orkun,S., & Batislam,E. (2005) Relationship between serum sex steroids and Aging Male Symptoms score and International Index of Erectile Function. *Urology* **66**, 597-601.

Baulieu,E.E., Thomas,G., Legrain,S., Lahlou,N., Roger,M., Debuire,B., Faucounau,V., Girard,L., Hervy,M.P., Latour,F., Leaud,M.C., Mokrane,A., Pitti-Ferrandi,H., Trivalle,C., de,L.O., Nouveau,S., Rakoto-Arison,B., Souberbielle,J.C., Raison,J., Le,B.Y., Raynaud,A., Girerd,X., & Forette,F. (2000) Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 4279-4284.

Beral,V. (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* **362**, 419-427.

Bergendahl,M., Iranmanesh,A., Pastor,C., Evans,W.S., & Veldhuis,J.D. (2000) Homeostatic joint amplification of pulsatile and 24-hour rhythmic cortisol secretion by fasting stress in midluteal phase women: concurrent disruption of cortisol-growth hormone, cortisol-luteinizing hormone, and cortisol-leptin synchrony. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**, 4028-4035.

Bernini,G.P., Sgro',M., Moretti,A., Argenio,G.F., Barlascini,C.O., Cristofani,R., & Salvetti,A. (1999) Endogenous androgens and carotid intimal-medial thickness in women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84**, 2008-2012.

Bertalan,R., Patocs,A., Boyle,B., Rigo,J., & Racz,K. (2009) The protective effect of the ER22/23EK polymorphism against an excessive weight gain during pregnancy. *Gynecol.Endocrinol.* **25**, 379-382.

Berthold,H.K., Giannakidou,E., Krone,W., Mantzoros,C.S., & Gouni-Berthold,I. (2009) The Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene is associated with a decreased risk for type 2 diabetes. *Clin.Chim.Acta* **399**, 112-116.

- Berthold,H.K., Giannakidou,E., Krone,W., Tregouet,D.A., & Gouni-Berthold,I. (2010) Influence of ghrelin gene polymorphisms on hypertension and atherosclerotic disease. *Hypertens.Res.* **33**, 155-160.
- Bialek,M., Zaremba,P., Borowicz,K.K., & Czuczwar,S.J. (2004) Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Pol.J.Pharmacol.* **56**, 509-518.
- Bing,C., Ambye,L., Fenger,M., Jorgensen,T., Borch-Johnsen,K., Madsbad,S., & Urhammer,S.A. (2005) Large-scale studies of the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene in relation to the metabolic syndrome and associated quantitative traits. *Diabet.Med.* **22**, 1157-1160.
- Bischoff,H.A., Stahelin,H.B., Urscheler,N., Ehrensam,R., Vonthein,R., Perrig-Chiello,P., Tyndall,A., & Theiler,R. (1999) Muscle strength in the elderly: its relation to vitamin D metabolites. *Arch.Phys.Med.Rehabil.* **80**, 54-58.
- Bishop,N.A., Lu,T., & Yankner,B.A. (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* **464**, 529-535.
- Blackburn,E.H., Greider,C.W., & Szostak,J.W. (2006) Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat.Med.* **12**, 1133-1138.
- Blasco,M.A. (2007) Telomere length, stem cells and aging. *Nat.Chem.Biol.* **3**, 640-649.
- Bodnar,A.G., Ouellette,M., Frolkis,M., Holt,S.E., Chiu,C.P., Morin,G.B., Harley,C.B., Shay,J.W., Lichtsteiner,S., & Wright,W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352.
- Boix, E. & Picó, A.M. (2000) Funciones endocrinas y envejecimiento. *Endocrin Nutr* **47**, 113-121.
- Bologa,L., Sharma,J., & Roberts,E. (1987) Dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative reduce neuronal death and enhance astrocytic differentiation in brain cell cultures. *J.Neurosci.Res.* **17**, 225-234.
- Bonafe,M., Barbieri,M., Marchegiani,F., Olivieri,F., Ragno,E., Giampieri,C., Mugianesi,E., Centurelli,M., Franceschi,C., & Paolisso,G. (2003) Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **88**, 3299-3304.
- Boyle,P.A., Buchman,A.S., Wilson,R.S., Leurgans,S.E., & Bennett,D.A. (2010) Physical frailty is associated with incident mild cognitive impairment in community-based older persons. *J.Am.Geriatr.Soc.* **58**, 248-255.
- Bresciani,E., Rapetti,D., Dona,F., Bulgarelli,I., Tamiazzo,L., Locatelli,V., & Torsello,A. (2006) Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosterone secretion in the rat. *J.Endocrinol.Invest* **29**, RC16-RC18.

Brill,K.T., Weltman,A.L., Gentili,A., Patrie,J.T., Fryburg,D.A., Hanks,J.B., Urban,R.J., & Veldhuis,J.D. (2002) Single and combined effects of growth hormone and testosterone administration on measures of body composition, physical performance, mood, sexual function, bone turnover, and muscle gene expression in healthy older men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87**, 5649-5657.

Bruehl,H., Wolf,O.T., Sweat,V., Tirsi,A., Richardson,S., & Convit,A. (2009) Modifiers of cognitive function and brain structure in middle-aged and elderly individuals with type 2 diabetes mellitus. *Brain Res.* **1280**, 186-194.

Brugts,M.P., van den Beld,A.W., Hofland,L.J., van der,W.K., van Koetsveld,P.M., Frystyk,J., Lamberts,S.W., & Janssen,J.A. (2008) Low circulating insulin-like growth factor I bioactivity in elderly men is associated with increased mortality. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **93**, 2515-2522.

Brugts,M.P., van Duijn,C.M., Hofland,L.J., Witteman,J.C., Lamberts,S.W., & Janssen,J.A. (2010) Igf-I bioactivity in an elderly population: relation to insulin sensitivity, insulin levels, and the metabolic syndrome. *Diabetes* **59**, 505-508.

Cameron,A.J., Magliano,D.J., & Soderberg,S. (2013) A systematic review of the impact of including both waist and hip circumference in risk models for cardiovascular diseases, diabetes and mortality. *Obes.Rev.* **14**, 86-94.

Cappola,A.R., Bandeen-Roche,K., Wand,G.S., Volpato,S., & Fried,L.P. (2001) Association of IGF-I levels with muscle strength and mobility in older women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 4139-4146.

Cappola,A.R., Xue,Q.L., Ferrucci,L., Guralnik,J.M., Volpato,S., & Fried,L.P. (2003) Insulin-like growth factor I and interleukin-6 contribute synergistically to disability and mortality in older women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **88**, 2019-2025.

Carlini,V.P., Ghersi,M., Schioth,H.B., & de,B., Sr. (2010) Ghrelin and memory: differential effects on acquisition and retrieval. *Peptides* **31**, 1190-1193.

Carlini,V.P., Monzon,M.E., Varas,M.M., Cragolini,A.B., Schioth,H.B., Scimonelli,T.N., & de,B., Sr. (2002) Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats 1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **299**, 739-743.

Carlini,V.P., Schioth,H.B., & Debarioglio,S.R. (2007) Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **352**, 907-912.

Carlini,V.P., Varas,M.M., Cragolini,A.B., Schioth,H.B., Scimonelli,T.N., & de,B., Sr. (2004) Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin 1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **313**, 635-641.

Carmienke,S., Freitag,M.H., Pischon,T., Schlattmann,P., Fankhaenel,T., Goebel,H., & Gensichen,J. (2013) General and abdominal obesity parameters and their combination in

relation to mortality: a systematic review and meta-regression analysis. *Eur.J.Clin.Nutr.* **67**, 573-585.

Carr,M.C. (2003) The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **88**, 2404-2411.

Carrascosa,A., Audi,L., Bosch-Castane,J., Gussinye,M., Yeste,D., Albisu,M.A., Clemente,M., Ferrandez,A., & Bager,L. (2008) [Influence of the age at the start of pubertal growth on adult height]. *Med.Clin.(Barc.)* **130**, 645-649.

Carroll,B.J., Feinberg,M., Greden,J.F., Tarika,J., Albala,A.A., Haskett,R.F., James,N.M., Kronfol,Z., Lohr,N., Steiner,M., de Vigne,J.P., & Young,E. (1981) A specific laboratory test for the diagnosis of melancholia. Standardization, validation, and clinical utility. *Arch.Gen.Psychiatry* **38**, 15-22.

Ceda,G.P., Dall'Aglio,E., Maggio,M., Lauretani,F., Bandinelli,S., Falzoi,C., Grimaldi,W., Ceresini,G., Corradi,F., Ferrucci,L., Valenti,G., & Hoffman,A.R. (2005) Clinical implications of the reduced activity of the GH-IGF-I axis in older men. *J.Endocrinol.Invest* **28**, 96-100.

Chakravarti,S., Collins,W.P., Forecast,J.D., Newton,J.R., Oram,D.H., & Studd,J.W. (1976) Hormonal profiles after the menopause. *Br.Med.J.* **2**, 784-787.

Chan,J.M., Stampfer,M.J., Giovannucci,E., Gann,P.H., Ma,J., Wilkinson,P., Hennekens,C.H., & Pollak,M. (1998) Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* **279**, 563-566.

Chanoine,J.P., Wong,A.C., & Barrios,V. (2006) Obestatin, acylated and total ghrelin concentrations in the perinatal rat pancreas. *Horm.Res.* **66**, 81-88.

Chapman,I.M., MacIntosh,C.G., Morley,J.E., & Horowitz,M. (2002) The anorexia of ageing. *Biogerontology*. **3**, 67-71.

Chartrel,N., vear-Perez,R., Leprince,J., Iturrioz,X., Reaux-Le,G.A., Audinot,V., Chomarat,P., Coge,F., Nosjean,O., Rodriguez,M., Galizzi,J.P., Boutin,J.A., Vaudry,H., & Llorens-Cortes,C. (2007) Comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake". *Science* **315**, 766.

Chen,C.Y., Asakawa,A., Fujimiya,M., Lee,S.D., & Inui,A. (2009) Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol.Rev.* **61**, 430-481.

Chen,S., Nilsen,J., & Brinton,R.D. (2006) Dose and temporal pattern of estrogen exposure determines neuroprotective outcome in hippocampal neurons: therapeutic implications. *Endocrinology* **147**, 5303-5313.

Choi,H.J., Cho,Y.M., Moon,M.K., Choi,H.H., Shin,H.D., Jang,H.C., Kim,S.Y., Lee,H.K., & Park,K.S. (2006) Polymorphisms in the ghrelin gene are associated with serum high-density lipoprotein cholesterol level and not with type 2 diabetes mellitus in Koreans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **91**, 4657-4663.

- Clarke,B.L., Ebeling,P.R., Jones,J.D., Wahner,H.W., O'Fallon,W.M., Riggs,B.L., & Fitzpatrick,L.A. (2002) Predictors of bone mineral density in aging healthy men varies by skeletal site. *Calcif.Tissue Int.* **70**, 137-145.
- Clegg,A., Young,J., Iliffe,S., Rikkert,M.O., & Rockwood,K. (2013) Frailty in elderly people. *Lancet* **381**, 752-762.
- Clemmons,D.R. & Underwood,L.E. (1991) Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annu.Rev.Nutr.* **11**, 393-412.
- Cnop,M., Havel,P.J., Utzschneider,K.M., Carr,D.B., Sinha,M.K., Boyko,E.J., Retzlaff,B.M., Knopp,R.H., Brunzell,J.D., & Kahn,S.E. (2003) Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* **46**, 459-469.
- Cohen,H.J., Pieper,C.F., Harris,T., Rao,K.M., & Currie,M.S. (1997) The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **52**, M201-M208.
- Conti,B., Sanchez-Alavez,M., Winsky-Sommerer,R., Morale,M.C., Lucero,J., Brownell,S., Fabre,V., Huitron-Resendiz,S., Henriksen,S., Zorrilla,E.P., de,L.L., & Bartfai,T. (2006) Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span. *Science* **314**, 825-828.
- Cornali,C., Franzoni,S., Frisoni,G.B., & Trabucchi,M. (2005) Anorexia as an independent predictor of mortality. *J.Am.Geriatr.Soc.* **53**, 354-355.
- Corona,G., Rastrelli,G., Giagulli,V.A., Sila,A., Sforza,A., Forti,G., Mannucci,E., & Maggi,M. (2013) Dehydroepiandrosterone supplementation in elderly men: a meta-analysis study of placebo-controlled trials. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **98**, 3615-3626.
- Corpas,E., Harman,S.M., & Blackman,M.R. (1993) Human growth hormone and human aging. *Endocr.Rev.* **14**, 20-39.
- Cruz-Jentoft,A.J., Baeyens,J.P., Bauer,J.M., Boirie,Y., Cederholm,T., Landi,F., Martin,F.C., Michel,J.P., Rolland,Y., Schneider,S.M., Topinkova,E., Vandewoude,M., & Zamboni,M. (2010) Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* **39**, 412-423.
- Cukierman-Yaffe,T., Gerstein,H.C., Williamson,J.D., Lazar,R.M., Lovato,L., Miller,M.E., Coker,L.H., Murray,A., Sullivan,M.D., Marcovina,S.M., & Launer,L.J. (2009) Relationship between baseline glycemic control and cognitive function in individuals with type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors: the action to control cardiovascular risk in diabetes-memory in diabetes (ACCORD-MIND) trial. *Diabetes Care* **32**, 221-226.
- Cummings,D.E., Purnell,J.Q., Frayo,R.S., Schmidova,K., Wisse,B.E., & Weigle,D.S. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* **50**, 1714-1719.

- Das,U.N. (2004) Metabolic syndrome X: an inflammatory condition? *Curr.Hypertens.Rep.* **6**, 66-73.
- Davis,S.R., Davison,S.L., Donath,S., & Bell,R.J. (2005) Circulating androgen levels and self-reported sexual function in women. *JAMA* **294**, 91-96.
- Davis,S.R., Panjari,M., & Stanczyk,F.Z. (2011) Clinical review: DHEA replacement for postmenopausal women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **96**, 1642-1653.
- Davis,S.R., Shah,S.M., McKenzie,D.P., Kulkarni,J., Davison,S.L., & Bell,R.J. (2008) Dehydroepiandrosterone sulfate levels are associated with more favorable cognitive function in women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **93**, 801-808.
- de Groot,C.P., van Staveren,W.A., & de,G.C. (2000) Determinants of macronutrient intake in elderly people. *Eur.J.Clin.Nutr.* **54 Suppl 3**, S70-S76.
- de Hollander,E.L., Bemelmans,W.J., Boshuizen,H.C., Friedrich,N., Wallaschofski,H., Guallar-Castillon,P., Walter,S., Zillikens,M.C., Rosengren,A., Lissner,L., Bassett,J.K., Giles,G.G., Orsini,N., Heim,N., Visser,M., & de Groot,L.C. (2012) The association between waist circumference and risk of mortality considering body mass index in 65- to 74-year-olds: a meta-analysis of 29 cohorts involving more than 58 000 elderly persons. *Int.J.Epidemiol.* **41**, 805-817.
- de Padua,M.A., Silva,T.C., Takada,J.Y., Avakian,S.D., Strunz,C.M., hado Cesar,L.A., Mendes,A.J., & Ramires,J.A. (2012) Long-term prospective study of the influence of estrone levels on events in postmenopausal women with or at high risk for coronary artery disease. *ScientificWorldJournal.* **2012**, 363595.
- De,S.B., Vergote,V., Pezeshki,A., Peremans,K., & Burvenich,C. (2008) Impurity profiling quality control testing of synthetic peptides using liquid chromatography-photodiode array-fluorescence and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the obestatin case. *Anal.Biochem.* **376**, 229-234.
- der Wiel,A.B., van,E.E., de Craen,A.J., Gussekloo,J., Lagaay,A.M., Knook,D.L., & Westendorp,R.G. (2002) A high response is not essential to prevent selection bias: results from the Leiden 85-plus study. *J.Clin.Epidemiol.* **55**, 1119-1125.
- Derby,C.A., Zilber,S., Brambilla,D., Morales,K.H., & McKinlay,J.B. (2006) Body mass index, waist circumference and waist to hip ratio and change in sex steroid hormones: the Massachusetts Male Ageing Study. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **65**, 125-131.
- DeRijk,R.H., Schaaf,M., & de Kloet,E.R. (2002) Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **81**, 103-122.
- Despres,J.P. & Lemieux,I. (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**, 881-887.

- Deuschle,M., Gotthardt,U., Schweiger,U., Weber,B., Korner,A., Schmider,J., Standhardt,H., Lammers,C.H., & Heuser,I. (1997) With aging in humans the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal system increases and its diurnal amplitude flattens. *Life Sci.* **61**, 2239-2246.
- Diano,S., Farr,S.A., Benoit,S.C., McNay,E.C., da,S., I, Horvath,B., Gaskin,F.S., Nonaka,N., Jaeger,L.B., Banks,W.A., Morley,J.E., Pinto,S., Sherwin,R.S., Xu,L., Yamada,K.A., Sleeman,M.W., Tschop,M.H., & Horvath,T.L. (2006) Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat.Neurosci.* **9**, 381-388.
- Ding,E.L., Song,Y., Malik,V.S., & Liu,S. (2006) Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **295**, 1288-1299.
- Djousse,L., Himali,J.J., Beiser,A., Kelly-Hayes,M., & Wolf,P.A. (2009) Apolipoprotein e, alcohol consumption, and risk of ischemic stroke: the Framingham Heart Study revisited. *J.Stroke Cerebrovasc.Dis.* **18**, 384-388.
- Dobson,M.G., Redfern,C.P., Unwin,N., & Weaver,J.U. (2001) The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor: potential contribution to central obesity in men and lack of association with other risk factors for coronary heart disease and diabetes mellitus. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 2270-2274.
- Dolle,M.E., Snyder,W.K., Gossen,J.A., Lohman,P.H., & Vijg,J. (2000) Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 8403-8408.
- Dubal,D.B., Zhu,H., Yu,J., Rau,S.W., Shughrue,P.J., Merchenthaler,I., Kindy,M.S., & Wise,P.M. (2001) Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 1952-1957.
- Echwald,S.M., Sorensen,T.I., Andersen,T., & Pedersen,O. (2001) The Asn363Ser variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with obesity or weight gain in Danish men. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **25**, 1563-1565.
- Edwards,B.J. & Li,J. (2013) Endocrinology of menopause. *Periodontol.2000.* **61**, 177-194.
- Edwards,B.J., Perry,H.M., Kaiser,F.E., Morley,J.E., Kraenzle,D., Kreutter,D.K., & Stevenson,R.W. (1996) Age-related changes in amylin secretion. *Mech.Ageing Dev.* **86**, 39-51.
- Egido,E.M., Hernandez,R., Marco,J., & Silvestre,R.A. (2009) Effect of obestatin on insulin, glucagon and somatostatin secretion in the perfused rat pancreas. *Regul.Pept.* **152**, 61-66.
- Epelbaum,J., Bedjaoui,N., Dardennes,R., Feng,D.D., Gardette,R., Grouselle,D., Loudes,C., Simon,A., Tolle,V., Yang,S.K., & Zizzari,P. (2010) Role of the ghrelin/obestatin balance in the regulation of neuroendocrine circuits controlling body composition and energy homeostasis. *Mol.Cell Endocrinol.* **314**, 244-247.
- Erfurth,E.M., Hagmar,L.E., Saaf,M., & Hall,K. (1996) Serum levels of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein 1 correlate with serum free testosterone and sex

hormone binding globulin levels in healthy young and middle-aged men. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **44**, 659-664.

Espeland,M.A., Stefanick,M.L., Kritz-Silverstein,D., Fineberg,S.E., Waclawiw,M.A., James,M.K., & Greendale,G.A. (1997) Effect of postmenopausal hormone therapy on body weight and waist and hip girths. Postmenopausal Estrogen-Progestin Interventions Study Investigators. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**, 1549-1556.

Espinoza,S.E., Jung,I., & Hazuda,H. (2012) Frailty transitions in the San Antonio Longitudinal Study of Aging. *J.Am.Geriatr.Soc.* **60**, 652-660.

Evert,J., Lawler,E., Bogan,H., & Perls,T. (2003) Morbidity profiles of centenarians: survivors, delayers, and escapers. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **58**, 232-237.

Feldman,H.A., Johannes,C.B., Araujo,A.B., Mohr,B.A., Longcope,C., & McKinlay,J.B. (2001) Low dehydroepiandrosterone and ischemic heart disease in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts Male Aging Study. *Am.J.Epidemiol.* **153**, 79-89.

Feldman,H.A., Longcope,C., Derby,C.A., Johannes,C.B., Araujo,A.B., Coviello,A.D., Bremner,W.J., & McKinlay,J.B. (2002) Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87**, 589-598.

Feng,D.D., Yang,S.K., Loudes,C., Simon,A., Al-Sarraf,T., Culler,M., vejar-Perez,R., Llorens-Cortes,C., Chen,C., Epelbaum,J., & Gardette,R. (2011) Ghrelin and obestatin modulate growth hormone-releasing hormone release and synaptic inputs onto growth hormone-releasing hormone neurons. *Eur.J.Neurosci.* **34**, 732-744.

Ferrari,E., Cravello,L., Muzzoni,B., Casarotti,D., Paltro,M., Solerte,S.B., Fioravanti,M., Cuzzoni,G., Pontiggia,B., & Magri,F. (2001) Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. *Eur.J.Endocrinol.* **144**, 319-329.

Ferrari,E., Magri,F., Dori,D., Migliorati,G., Nescis,T., Molla,G., Fioravanti,M., & Solerte,S.B. (1995) Neuroendocrine correlates of the aging brain in humans. *Neuroendocrinology* **61**, 464-470.

Filigheddu,N., Gnocchi,V.F., Coscia,M., Cappelli,M., Porporato,P.E., Taulli,R., Traini,S., Baldanzi,G., Chianale,F., Cutrupi,S., Arnoletti,E., Ghe,C., Fubini,A., Surico,N., Sinigaglia,F., Ponzetto,C., Muccioli,G., Crepaldi,T., & Graziani,A. (2007) Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells *6. Mol.Biol.Cell* **18**, 986-994.

Fink,H.A., Ewing,S.K., Ensrud,K.E., Barrett-Connor,E., Taylor,B.C., Cauley,J.A., & Orwoll,E.S. (2006) Association of testosterone and estradiol deficiency with osteoporosis and rapid bone loss in older men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **91**, 3908-3915.

- Finken,M.J., Meulenbelt,I., Dekker,F.W., Frolich,M., Romijn,J.A., Slagboom,P.E., & Wit,J.M. (2007) The 23K variant of the R23K polymorphism in the glucocorticoid receptor gene protects against postnatal growth failure and insulin resistance after preterm birth. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **92**, 4777-4782.
- Fletcher,O., Gibson,L., Johnson,N., Altmann,D.R., Holly,J.M., Ashworth,A., Peto,J., & Silva,I.S. (2005) Polymorphisms and circulating levels in the insulin-like growth factor system and risk of breast cancer: a systematic review. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **14**, 2-19.
- Flurkey,K., Papaconstantinou,J., Miller,R.A., & Harrison,D.E. (2001) Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 6736-6741.
- Folsom,A.R., Kaye,S.A., Sellers,T.A., Hong,C.P., Cerhan,J.R., Potter,J.D., & Prineas,R.J. (1993) Body fat distribution and 5-year risk of death in older women. *JAMA* **269**, 483-487.
- Fonda,S.J., Bertrand,R., O'Donnell,A., Longcope,C., & McKinlay,J.B. (2005) Age, hormones, and cognitive functioning among middle-aged and elderly men: cross-sectional evidence from the Massachusetts Male Aging Study. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **60**, 385-390.
- Fontana,L., Partridge,L., & Longo,V.D. (2010) Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* **328**, 321-326.
- Ford,E.S. (2005) Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care* **28**, 1769-1778.
- Ford,E.S., Giles,W.H., & Dietz,W.H. (2002) Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* **287**, 356-359.
- Fraga,M.F. & Esteller,M. (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet.* **23**, 413-418.
- Frago,L.M., Baquedano,E., Argente,J., & Chowen,J.A. (2011) Neuroprotective actions of ghrelin and growth hormone secretagogues. *Front Mol.Neurosci.* **4**, 23.
- Frayling,T.M., Hattersley,A.T., McCarthy,A., Holly,J., Mitchell,S.M., Gloyn,A.L., Owen,K., Davies,D., Smith,G.D., & Ben-Shlomo,Y. (2002) A putative functional polymorphism in the IGF-I gene: association studies with type 2 diabetes, adult height, glucose tolerance, and fetal growth in U.K. populations. *Diabetes* **51**, 2313-2316.
- Fried,L.P., Ferrucci,L., Darer,J., Williamson,J.D., & Anderson,G. (2004) Untangling the concepts of disability, frailty, and comorbidity: implications for improved targeting and care. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **59**, 255-263.
- Gahete,M.D., Cordoba-Chacon,J., Kineman,R.D., Luque,R.M., & Castano,J.P. (2011) Role of ghrelin system in neuroprotection and cognitive functions: implications in Alzheimer's disease. *Peptides* **32**, 2225-2228.

Gahete,M.D., Rubio,A., Duran-Prado,M., Avila,J., Luque,R.M., & Castano,J.P. (2010) Expression of Somatostatin, cortistatin, and their receptors, as well as dopamine receptors, but not of neprilysin, are reduced in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients. *J.Alzheimers.Dis.* **20**, 465-475.

Galassi,A., Reynolds,K., & He,J. (2006) Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am.J.Med.* **119**, 812-819.

Gami,A.S., Witt,B.J., Howard,D.E., Erwin,P.J., Gami,L.A., Somers,V.K., & Montori,V.M. (2007) Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J.Am.Coll.Cardiol.* **49**, 403-414.

Garcia,E.A., King,P., Sidhu,K., Ohgusu,H., Walley,A., Lecoecur,C., Gueorguiev,M., Khalaf,S., Davies,D., Grossman,A.B., Kojima,M., Petersenn,S., Froguel,P., & Korbonits,M. (2009) The role of ghrelin and ghrelin-receptor gene variants and promoter activity in type 2 diabetes. *Eur.J.Endocrinol.* **161**, 307-315.

Garcia,J.M., Iyer,D., Poston,W.S., Marcelli,M., Reeves,R., Foreyt,J., & Balasubramanyam,A. (2006) Rise of plasma ghrelin with weight loss is not sustained during weight maintenance. *Obesity.(Silver.Spring)* **14**, 1716-1723.

Garg,A. (2007) The ongoing saga of obestatin: is it a hormone? *J.Clin.Endocrinol.Metab* **92**, 3396-3398.

Gauna,C., Delhanty,P.J., Hofland,L.J., Janssen,J.A., Broglio,F., Ross,R.J., Ghigo,E., & van der Lely,A.J. (2005) Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **90**, 1055-1060.

Genazzani,A.D., Lanzoni,C., & Genazzani,A.R. (2007) Might DHEA be considered a beneficial replacement therapy in the elderly? *Drugs Aging* **24**, 173-185.

Genazzani,A.R., Stomati,M., Valentino,V., Pluchino,N., Pot,E., Casarosa,E., Merlini,S., Giannini,A., & Luisi,M. (2011) Effect of 1-year, low-dose DHEA therapy on climacteric symptoms and female sexuality. *Climacteric.* **14**, 661-668.

Gnanapavan,S., Kola,B., Bustin,S.A., Morris,D.G., McGee,P., Fairclough,P., Bhattacharya,S., Carpenter,R., Grossman,A.B., & Korbonits,M. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans 1. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87**, 2988.

Goodpaster,B.H., Park,S.W., Harris,T.B., Kritchevsky,S.B., Nevitt,M., Schwartz,A.V., Simonsick,E.M., Tylavsky,F.A., Visser,M., & Newman,A.B. (2006) The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **61**, 1059-1064.

Grabowski,D.C. & Ellis,J.E. (2001) High body mass index does not predict mortality in older people: analysis of the Longitudinal Study of Aging. *J.Am.Geriatr.Soc.* **49**, 968-979.

Granata,R., Settanni,F., Gallo,D., Trovato,L., Biancone,L., Cantaluppi,V., Nano,R., Annunziata,M., Campiglia,P., Arnoletti,E., Ghe,C., Volante,M., Papotti,M., Muccioli,G., & Ghigo,E. (2008) Obestatin promotes survival of pancreatic beta-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of beta-cell mass and function. *Diabetes* **57**, 967-979.

Gras-Miralles,B. & Cremonini,F. (2013) A critical appraisal of lubiprostone in the treatment of chronic constipation in the elderly. *Clin.Interv.Aging* **8**, 191-200.

Green,B.D., Irwin,N., & Flatt,P.R. (2007) Direct and indirect effects of obestatin peptides on food intake and the regulation of glucose homeostasis and insulin secretion in mice. *Peptides* **28**, 981-987.

Gualillo,O., Lago,F., Casanueva,F.F., & Dieguez,C. (2006) One ancestor, several peptides post-translational modifications of preproghrelin generate several peptides with antithetical effects. *Mol.Cell Endocrinol.* **256**, 1-8.

Guo,Z.F., Zheng,X., Qin,Y.W., Hu,J.Q., Chen,S.P., & Zhang,Z. (2007) Circulating preprandial ghrelin to obestatin ratio is increased in human obesity. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **92**, 1875-1880.

Gurnell,E.M. & Chatterjee,V.K. (2001) Dehydroepiandrosterone replacement therapy. *Eur.J.Endocrinol.* **145**, 103-106.

Gurriaran-Rodriguez,U., Al-Massadi,O., Roca-Rivada,A., Crujeiras,A.B., Gallego,R., Pardo,M., Seoane,L.M., Pazos,Y., Casanueva,F.F., & Camina,J.P. (2011) Obestatin as a regulator of adipocyte metabolism and adipogenesis. *J.Cell Mol.Med.* **15**, 1927-1940.

Haffner,S.M. (2006) The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Am.J.Cardiol.* **97**, 3A-11A.

Han,S. & Brunet,A. (2012) Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends Cell Biol.* **22**, 42-49.

Hand,B.D., Kostek,M.C., Ferrell,R.E., Delmonico,M.J., Douglass,L.W., Roth,S.M., Hagberg,J.M., & Hurley,B.F. (2007) Influence of promoter region variants of insulin-like growth factor pathway genes on the strength-training response of muscle phenotypes in older adults. *J.Appl.Physiol* **103**, 1678-1687.

Hankinson,S.E., Willett,W.C., Colditz,G.A., Hunter,D.J., Michaud,D.S., Deroo,B., Rosner,B., Speizer,F.E., & Pollak,M. (1998) Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* **351**, 1393-1396.

Haring,R., Teng,Z., Xanthakis,V., Coviello,A., Sullivan,L., Bhasin,S., Murabito,J.M., Wallaschofski,H., & Vasan,R.S. (2013) Association of sex steroids, gonadotrophins, and their trajectories with clinical cardiovascular disease and all-cause mortality in elderly men from the Framingham Heart Study. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **78**, 629-634.

- Harman,S.M., Metter,E.J., Tobin,J.D., Pearson,J., & Blackman,M.R. (2001) Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 724-731.
- Harris,M.I. (1990) Epidemiology of diabetes mellitus among the elderly in the United States. *Clin.Geriatr.Med.* **6**, 703-719.
- Harris,T.B., Ferrucci,L., Tracy,R.P., Corti,M.C., Wacholder,S., Ettinger,W.H., Jr., Heimovitz,H., Cohen,H.J., & Wallace,R. (1999) Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am.J.Med.* **106**, 506-512.
- Harrison-Bernard,L.M. & Raij,L. (2000) Postmenopausal hypertension. *Curr.Hypertens.Rep.* **2**, 202-207.
- Hassouna,R., Zizzari,P., & Tolle,V. (2010) The ghrelin/obestatin balance in the physiological and pathological control of growth hormone secretion, body composition and food intake. *J.Neuroendocrinol.* **22**, 793-804.
- Hayashi,T., Esaki,T., Muto,E., Kano,H., Asai,Y., Thakur,N.K., Sumi,D., Jayachandran,M., & Iguchi,A. (2000) Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen: the possible role of nitric oxide. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **20**, 782-792.
- Heaney,J.L., Phillips,A.C., & Carroll,D. (2012) Ageing, physical function, and the diurnal rhythms of cortisol and dehydroepiandrosterone. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 341-349.
- Herbert,J. (1995) The age of dehydroepiandrosterone. *Lancet* **345**, 1193-1194.
- Herrington,D.M. (1995) Dehydroepiandrosterone and coronary atherosclerosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **774**, 271-280.
- Herrington,D.M., Gordon,G.B., Achuff,S.C., Trejo,J.F., Weisman,H.F., Kwiterovich,P.O., Jr., & Pearson,T.A. (1990) Plasma dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in patients undergoing diagnostic coronary angiography. *J.Am.Coll.Cardiol.* **16**, 862-870.
- Hinney,A., Hoch,A., Geller,F., Schafer,H., Siegfried,W., Goldschmidt,H., Remschmidt,H., & Hebebrand,J. (2002) Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87**, 2716.
- Holick,M.F. (2007) Vitamin D deficiency. *N.Engl.J.Med.* **357**, 266-281.
- Horstman,A.M., Dillon,E.L., Urban,R.J., & Sheffield-Moore,M. (2012) The role of androgens and estrogens on healthy aging and longevity. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **67**, 1140-1152.
- Hovind,P., Lamberts,S., Hop,W., Deinum,J., Tarnow,L., Parving,H.H., & Janssen,J.A. (2007) An IGF-I gene polymorphism modifies the risk of developing persistent microalbuminuria in type 1 diabetes. *Eur.J.Endocrinol.* **156**, 83-90.

Hsu,B., Cumming,R.G., Blyth,F.M., Naganathan,V., Le Couteur,D.G., Seibel,M.J., Waite,L.M., & Handelsman,D.J. (2014) Longitudinal and cross-sectional relationships of circulating reproductive hormone levels to self-rated health and health-related quality of life in community-dwelling older men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* jc20133984.

Hubacek,J.A., Adamkova,V., Bohuslavova,R., Suchanek,P., Poledne,R., & Lanska,V. (2008) No significant association between A-501C single nucleotide polymorphism in preproghrelin and body mass index or waist-to-hip ratio in central European population. *Metabolism* **57**, 1016-1017.

Hubacek,J.A., Bohuslavova,R., Skodova,Z., & Adamkova,V. (2007) Variants within the ghrelin gene--association with HDL-cholesterol, but not with body mass index. *Folia Biol.(Praha)* **53**, 202-206.

Huda,M.S., Durham,B.H., Wong,S.P., Deepak,D., Kerrigan,D., McCulloch,P., Ranganath,L., Pinkney,J., & Wilding,J.P. (2008) Plasma obestatin levels are lower in obese and post-gastrectomy subjects, but do not change in response to a meal. *Int.J.Obes.(Lond)* **32**, 129-135.

Hughes,T.F., Borenstein,A.R., Schofield,E., Wu,Y., & Larson,E.B. (2009) Association between late-life body mass index and dementia: The Kame Project. *Neurology* **72**, 1741-1746.

Hughes,V.A., Roubenoff,R., Wood,M., Frontera,W.R., Evans,W.J., & Fiatarone Singh,M.A. (2004) Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *Am.J.Clin.Nutr.* **80**, 475-482.

Huizenga,N.A., Koper,J.W., De Lange,P., Pols,H.A., Stolk,R.P., Burger,H., Grobbee,D.E., Brinkmann,A.O., de Jong,F.H., & Lamberts,S.W. (1998) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **83**, 144-151.

Hunt,P.J., Gurnell,E.M., Huppert,F.A., Richards,C., Prevost,A.T., Wass,J.A., Herbert,J., & Chatterjee,V.K. (2000) Improvement in mood and fatigue after dehydroepiandrosterone replacement in Addison's disease in a randomized, double blind trial. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**, 4650-4656.

Igwebuike,A., Irving,B.A., Bigelow,M.L., Short,K.R., McConnell,J.P., & Nair,K.S. (2008) Lack of dehydroepiandrosterone effect on a combined endurance and resistance exercise program in postmenopausal women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **93**, 534-538.

Jackson,V.R., Nothacker,H.P., & Civelli,O. (2006) GPR39 receptor expression in the mouse brain. *Neuroreport* **17**, 813-816.

Jamshed,N., Ozair,F.F., Aggarwal,P., & Ekka,M. (2014) Alzheimer disease in post-menopausal women: Intervene in the critical window period. *J.Midlife.Health* **5**, 38-40.

Jankord,R. & Herman,J.P. (2008) Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1148**, 64-73.

Janssen,I., Katzmarzyk,P.T., & Ross,R. (2005) Body mass index is inversely related to mortality in older people after adjustment for waist circumference. *J.Am.Geriatr.Soc.* **53**, 2112-2118.

Janssen,J.A. & Lamberts,S.W. (2004) Igf-I and longevity. *Horm.Res.* **62 Suppl 3**, 104-109.

Jaskelioff,M., Muller,F.L., Paik,J.H., Thomas,E., Jiang,S., Adams,A.C., Sahin,E., Kost-Alimova,M., Protopopov,A., Cadinanos,J., Horner,J.W., Maratos-Flier,E., & DePinho,R.A. (2011) Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* **469**, 102-106.

Jo,D.S., Kim,S.L., Kim,S.Y., Hwang,P.H., Lee,K.H., & Lee,D.Y. (2005) Preproghrelin Leu72Met polymorphism in obese Korean children. *J.Pediatr.Endocrinol.Metab* **18**, 1083-1086.

Joseph,C., Kenny,A.M., Taxel,P., Lorenzo,J.A., Duque,G., & Kuchel,G.A. (2005) Role of endocrine-immune dysregulation in osteoporosis, sarcopenia, frailty and fracture risk. *Mol.Aspects Med.* **26**, 181-201.

Juul,A., Scheike,T., Davidsen,M., Gyllenborg,J., & Jorgensen,T. (2002) Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study. *Circulation* **106**, 939-944.

Kahonen,M.H., Tilvis,R.S., Jolkkonen,J., Pitkala,K., & Harkonen,M. (2000) Predictors and clinical significance of declining plasma dehydroepiandrosterone sulfate in old age. *Aging (Milano.)* **12**, 308-314.

Kalmijn,S., Janssen,J.A., Pols,H.A., Lamberts,S.W., & Breteler,M.M. (2000) A prospective study on circulating insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding proteins, and cognitive function in the elderly. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**, 4551-4555.

Kalmijn,S., Launer,L.J., Stolk,R.P., de Jong,F.H., Pols,H.A., Hofman,A., Breteler,M.M., & Lamberts,S.W. (1998) A prospective study on cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate, and cognitive function in the elderly. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **83**, 3487-3492.

Kanehisa,M., Akiyoshi,J., Kitaichi,T., Matsushita,H., Tanaka,E., Kodama,K., Hanada,H., & Isogawa,K. (2006) Administration of antisense DNA for ghrelin causes an antidepressant and anxiolytic response in rats. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* **30**, 1403-1407.

Kannel,W.B. & Wilson,P.W. (1997) Comparison of risk profiles for cardiovascular events: implications for prevention. *Adv.Intern.Med.* **42**, 39-66.

Kaplan,S.A., Meehan,A.G., & Shah,A. (2006) The age related decrease in testosterone is significantly exacerbated in obese men with the metabolic syndrome. What are the implications for the relatively high incidence of erectile dysfunction observed in these men? *J.Urol.* **176**, 1524-1527.

Katzmarzyk,P.T., Hu,G., Cefalu,W.T., Mire,E., & Bouchard,C. (2013) The Importance of Waist Circumference and BMI for Mortality Risk in Diabetic Adults. *Diabetes Care* **36**, 3128-3130.

- Kelijman, M. (1991) Age-related alterations of the growth hormone/insulin-like-growth-factor I axis. *J.Am.Geriatr.Soc.* **39**, 295-307.
- Kellokoski, E., Kunnari, A., Jokela, M., Makela, S., Kesaniemi, Y.A., & Horkko, S. (2009) Ghrelin and obestatin modulate early atherogenic processes on cells: enhancement of monocyte adhesion and oxidized low-density lipoprotein binding. *Metabolism* **58**, 1572-1580.
- Khaw, K.T., Dowsett, M., Folkard, E., Bingham, S., Wareham, N., Luben, R., Welch, A., & Day, N. (2007) Endogenous testosterone and mortality due to all causes, cardiovascular disease, and cancer in men: European prospective investigation into cancer in Norfolk (EPIC-Norfolk) Prospective Population Study. *Circulation* **116**, 2694-2701.
- Kiel, D.P., Puhl, J., Rosen, C.J., Berg, K., Murphy, J.B., & MacLean, D.B. (1998) Lack of an association between insulin-like growth factor-I and body composition, muscle strength, physical performance or self-reported mobility among older persons with functional limitations. *J.Am.Geriatr.Soc.* **46**, 822-828.
- Kiewiet, R.M., van Aken, M.O., van der, W.K., Uitterlinden, P., Themmen, A.P., Hofland, L.J., de Rijke, Y.B., Delhanty, P.J., Ghigo, E., Abribat, T., & van der Lely, A.J. (2009) Effects of acute administration of acylated and unacylated ghrelin on glucose and insulin concentrations in morbidly obese subjects without overt diabetes. *Eur.J.Endocrinol.* **161**, 567-573.
- Kinsella, K.G. (2005) Future longevity-demographic concerns and consequences. *J.Am.Geriatr.Soc.* **53**, S299-S303.
- Kirkwood, T.B. (2005) Understanding the odd science of aging. *Cell* **120**, 437-447.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. & Kangawa, K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656-60.
- Koper, J.W., Stolk, R.P., de, L.P., Huizenga, N.A., Molijn, G.J., Pols, H.A., Grobbee, D.E., Karl, M., de Jong, F.H., Brinkmann, A.O., & Lamberts, S.W. (1997) Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum.Genet.* **99**, 663-668.
- Korbonits, M., Gueorguiev, M., O'Grady, E., Lecoer, C., Swan, D.C., Mein, C.A., Weill, J., Grossman, A.B., & Froguel, P. (2002) A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87**, 4005-4008.
- Kostek, M.C., Delmonico, M.J., Reichel, J.B., Roth, S.M., Douglass, L., Ferrell, R.E., & Hurley, B.F. (2005) Muscle strength response to strength training is influenced by insulin-like growth factor 1 genotype in older adults. *J.Appl.Physiol* **98**, 2147-2154.
- Kostka, T., Arsac, L.M., Patricot, M.C., Berthouze, S.E., Lacour, J.R., & Bonnefoy, M. (2000) Leg extensor power and dehydroepiandrosterone sulfate, insulin-like growth factor-I and testosterone in healthy active elderly people. *Eur.J.Appl.Physiol* **82**, 83-90.

Kujoth,G.C., Hiona,A., Pugh,T.D., Someya,S., Panzer,K., Wohlgemuth,S.E., Hofer,T., Seo,A.Y., Sullivan,R., Jobling,W.A., Morrow,J.D., Van,R.H., Sedivy,J.M., Yamasoba,T., Tanokura,M., Weindruch,R., Leeuwenburgh,C., & Prolla,T.A. (2005) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**, 481-484.

Kupelian,V., Page,S.T., Araujo,A.B., Trivison,T.G., Bremner,W.J., & McKinlay,J.B. (2006a) Low sex hormone-binding globulin, total testosterone, and symptomatic androgen deficiency are associated with development of the metabolic syndrome in nonobese men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **91**, 843-850.

Kupelian,V., Shabsigh,R., Trivison,T.G., Page,S.T., Araujo,A.B., & McKinlay,J.B. (2006b) Is there a relationship between sex hormones and erectile dysfunction? Results from the Massachusetts Male Aging Study. *J.Urol.* **176**, 2584-2588.

Kushnir,M.M., Blamires,T., Rockwood,A.L., Roberts,W.L., Yue,B., Erdogan,E., Bunker,A.M., & Meikle,A.W. (2010) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals. *Clin.Chem.* **56**, 1138-1147.

Kuzuya,M., Ando,F., Iguchi,A., & Shimokata,H. (2006) Preproghrelin Leu72Met variant contributes to overweight in middle-aged men of a Japanese large cohort. *Int.J.Obes.(Lond)* **30**, 1609-1614.

Kwon,H.M., Kim,B.J., Lee,S.H., Choi,S.H., Oh,B.H., & Yoon,B.W. (2006) Metabolic syndrome as an independent risk factor of silent brain infarction in healthy people. *Stroke* **37**, 466-470.

Labrie,F., Archer,D., Bouchard,C., Fortier,M., Cusan,L., Gomez,J.L., Girard,G., Baron,M., Ayotte,N., Moreau,M., Dube,R., Cote,I., Labrie,C., Lavoie,L., Berube,R., Belanger,P., Berger,L., Gilbert,L., Martel,C., & Balsler,J. (2009) Serum steroid levels during 12-week intravaginal dehydroepiandrosterone administration. *Menopause.* **16**, 897-906.

Labrie,F., Belanger,A., Cusan,L., Gomez,J.L., & Candas,B. (1997) Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**, 2396-2402.

Lagaud,G.J., Young,A., Acena,A., Morton,M.F., Barrett,T.D., & Shankley,N.P. (2007) Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **357**, 264-269.

Lamberts,S.W. (2002) The endocrinology of aging and the brain. *Arch.Neurol.* **59**, 1709-1711.

Lamberts,S.W., Koper,J.W., Biemond,P., den Holder,F.H., & de Jong,F.H. (1992) Cortisol receptor resistance: the variability of its clinical presentation and response to treatment. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **74**, 313-321.

Lamberts,S.W., van den Beld,A.W., & van der Lely,A.J. (1997) The endocrinology of aging. *Science* **278**, 419-424.

- Landi,F., Liperoti,R., Lattanzio,F., Russo,A., Tosato,M., Barillaro,C., Bernabei,R., & Onder,G. (2012) Effects of anorexia on mortality among older adults receiving home care: an observation study. *J.Nutr.Health Aging* **16**, 79-83.
- Landin-Wilhelmsen,K., Wilhelmsen,L., Lappas,G., Rosen,T., Lindstedt,G., Lundberg,P.A., & Bengtsson,B.A. (1994) Serum insulin-like growth factor I in a random population sample of men and women: relation to age, sex, smoking habits, coffee consumption and physical activity, blood pressure and concentrations of plasma lipids, fibrinogen, parathyroid hormone and osteocalcin. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **41**, 351-357.
- Lang,P.O., Samaras,D., & Samaras,N. (2012) Testosterone replacement therapy in reversing "andropause": what is the proof-of-principle? *Rejuvenation.Res.* **15**, 453-465.
- Langenberg,C., Bergstrom,J., Laughlin,G.A., & Barrett-Connor,E. (2005) Ghrelin and the metabolic syndrome in older adults. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **90**, 6448-6453.
- Laudisio,A., Marzetti,E., Antonica,L., Pagano,F., Vetrano,D.L., Bernabei,R., & Zuccala,G. (2013) Metabolic syndrome and quality of life in the elderly: age and gender differences. *Eur.J.Nutr.* **52**, 307-316.
- Laughlin,G.A., Barrett-Connor,E., Criqui,M.H., & Kritz-Silverstein,D. (2004) The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **89**, 114-120.
- Le,R.D., Bondy,C., Yakar,S., Liu,J.L., & Butler,A. (2001) The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr.Rev.* **22**, 53-74.
- LeBlanc,E.S., Janowsky,J., Chan,B.K., & Nelson,H.D. (2001) Hormone replacement therapy and cognition: systematic review and meta-analysis. *JAMA* **285**, 1489-1499.
- Lebrun,C.E., van der Schouw,Y.T., de Jong,F.H., Pols,H.A., Grobbee,D.E., & Lamberts,S.W. (2006) Relations between body composition, functional and hormonal parameters and quality of life in healthy postmenopausal women. *Maturitas* **55**, 82-92.
- Lee,D.Y., Kim,S.Y., Jo,D.S., Hwang,P.H., Kang,K.P., Lee,S., Kim,W., & Park,S.K. (2006) Preproghrelin Leu72Met polymorphism predicts a lower rate of developing renal dysfunction in type 2 diabetic nephropathy. *Eur.J.Endocrinol.* **155**, 187-190.
- Legrain,S., Berr,C., Frenoy,N., Gourlet,V., Debuire,B., & Baulieu,E.E. (1995) Dehydroepiandrosterone sulfate in a long-term care aged population. *Gerontology* **41**, 343-351.
- Legrain,S., Massien,C., Lahlou,N., Roger,M., Debuire,B., Diquet,B., Chatellier,G., Azizi,M., Faucounau,V., Porchet,H., Forette,F., & Baulieu,E.E. (2000) Dehydroepiandrosterone replacement administration: pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in healthy elderly subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**, 3208-3217.

- Li,W.J., Zhen,Y.S., Sun,K., Xue,H., Song,X.D., Wang,Y.B., Fan,X.H., Han,Y.F., & Hui,R.T. (2008) Ghrelin receptor gene polymorphisms are associated with female metabolic syndrome in Chinese population. *Chin Med.J.(Engl.)* **121**, 1666-1669.
- li-Rachedi,A., Varndell,I.M., Adrian,T.E., Gapp,D.A., Van,N.S., Bloom,S.R., & Polak,J.M. (1984) Peptide YY (PYY) immunoreactivity is co-stored with glucagon-related immunoreactants in endocrine cells of the gut and pancreas. *Histochemistry* **80**, 487-491.
- Liao,N., Xie,Z.K., Huang,J., & Xie,Z.F. (2013) Association between the ghrelin Leu72Met polymorphism and type 2 diabetes risk: a meta-analysis. *Gene* **517**, 179-183.
- Licht,C.M., van Turenhout,L.C., Deijen,J.B., Koppes,L.L., van,M.W., Twisk,J.W., & Drent,M.L. (2014) The Association between IGF-1 Polymorphisms, IGF-1 Serum Levels, and Cognitive Functions in Healthy Adults: The Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study. *Int.J.Endocrinol.* **2014**, 181327.
- Lissner,L., Bjorkelund,C., Heitmann,B.L., Seidell,J.C., & Bengtsson,C. (2001) Larger hip circumference independently predicts health and longevity in a Swedish female cohort. *Obes.Res.* **9**, 644-646.
- Liu,B., Garcia,E.A., & Korbonits,M. (2011) Genetic studies on the ghrelin, growth hormone secretagogue receptor (GHSR) and ghrelin O-acyl transferase (GOAT) genes. *Peptides* **32**, 2191-2207.
- Liu,J., Liu,J., Tian,L.M., Liu,J.X., Bing,Y.J., Zhang,J.P., Wang,Y.F., & Zhang,L.Y. (2012) Association of ghrelin Leu72Met polymorphism with type 2 diabetes mellitus in Chinese population. *Gene* **504**, 309-312.
- Lopez-Otin,C., Blasco,M.A., Partridge,L., Serrano,M., & Kroemer,G. (2013) The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194-1217.
- Lu,S.F., Mo,Q., Hu,S., Garippa,C., & Simon,N.G. (2003) Dehydroepiandrosterone upregulates neural androgen receptor level and transcriptional activity. *J.Neurobiol.* **57**, 163-171.
- Luchsinger,J.A., Patel,B., Tang,M.X., Schupf,N., & Mayeux,R. (2007) Measures of adiposity and dementia risk in elderly persons. *Arch.Neurol.* **64**, 392-398.
- Lukanova,A., Toniolo,P., Akhmedkhanov,A., Biessy,C., Haley,N.J., Shore,R.E., Riboli,E., Rinaldi,S., & Kaaks,R. (2001) A prospective study of insulin-like growth factor-I, IGF-binding proteins-1, -2 and -3 and lung cancer risk in women. *Int.J.Cancer* **92**, 888-892.
- Lupien,S.J., Gaudreau,S., Tchiteya,B.M., Maheu,F., Sharma,S., Nair,N.P., Hauger,R.L., McEwen,B.S., & Meaney,M.J. (1997) Stress-induced declarative memory impairment in healthy elderly subjects: relationship to cortisol reactivity. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**, 2070-2075.
- Maas,J.A., Mook-Kanamori,D.O., Ay,L., Steegers,E.A., van Duijn,C.M., Hofman,A., Hokken-Koelega,A.C., & Jaddoe,V.W. (2010) Insulin VNTR and IGF-1 promoter region polymorphisms

are not associated with body composition in early childhood: the generation R study. *Horm.Res.Paediatr.* **73**, 120-127.

MacIntosh,C.G., Andrews,J.M., Jones,K.L., Wishart,J.M., Morris,H.A., Jansen,J.B., Morley,J.E., Horowitz,M., & Chapman,I.M. (1999) Effects of age on concentrations of plasma cholecystokinin, glucagon-like peptide 1, and peptide YY and their relation to appetite and pyloric motility. *Am.J.Clin.Nutr.* **69**, 999-1006.

Maegawa,S., Hinkal,G., Kim,H.S., Shen,L., Zhang,L., Zhang,J., Zhang,N., Liang,S., Donehower,L.A., & Issa,J.P. (2010) Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res.* **20**, 332-340.

Mager,U., Kolehmainen,M., Lindstrom,J., Eriksson,J.G., Valle,T.T., Hamalainen,H., Ilanne-Parikka,P., Keinanen-Kiukaanniemi,S., Tuomilehto,J.O., Pulkkinen,L., & Uusitupa,M.I. (2006a) Association between ghrelin gene variations and blood pressure in subjects with impaired glucose tolerance. *Am.J.Hypertens.* **19**, 920-926.

Mager,U., Lindi,V., Lindstrom,J., Eriksson,J.G., Valle,T.T., Hamalainen,H., Ilanne-Parikka,P., Keinanen-Kiukaanniemi,S., Tuomilehto,J., Laakso,M., Pulkkinen,L., & Uusitupa,M. (2006b) Association of the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene with the risk of Type 2 diabetes in subjects with impaired glucose tolerance in the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabet.Med.* **23**, 685-689.

Maggio,M., Ceda,G.P., Lauretani,F., Bandinelli,S., Metter,E.J., Guralnik,J.M., Basaria,S., Cattabiani,C., Luci,M., Dall'Aglio,E., Vignali,A., Volpi,R., Valenti,G., & Ferrucci,L. (2011) Gonadal status and physical performance in older men. *Aging Male.* **14**, 42-47.

Maggio,M., Lauretani,F., Ceda,G.P., Bandinelli,S., Ling,S.M., Metter,E.J., Artoni,A., Carassale,L., Cazzato,A., Ceresini,G., Guralnik,J.M., Basaria,S., Valenti,G., & Ferrucci,L. (2007) Relationship between low levels of anabolic hormones and 6-year mortality in older men: the aging in the Chianti Area (InCHIANTI) study. *Arch.Intern.Med.* **167**, 2249-2254.

Mariotti,S., Franceschi,C., Cossarizza,A., & Pinchera,A. (1995) The aging thyroid. *Endocr.Rev.* **16**, 686-715.

Markowska,A.L., Mooney,M., & Sonntag,W.E. (1998) Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience* **87**, 559-569.

Martin,G.R., Loreda,J.C., & Sun,G. (2008) Lack of association of ghrelin precursor gene variants and percentage body fat or serum lipid profiles. *Obesity.(Silver.Spring)* **16**, 908-912.

Matsushita,Y., Nakagawa,T., Yamamoto,S., Takahashi,Y., Yokoyama,T., Mizoue,T., & Noda,M. (2012) Effect of longitudinal changes in visceral fat area and other anthropometric indices to the changes in metabolic risk factors in Japanese men: the Hitachi Health Study. *Diabetes Care* **35**, 1139-1143.

- Matsushita,Y., Nakagawa,T., Yamamoto,S., Takahashi,Y., Yokoyama,T., Mizoue,T., & Noda,M. (2013) Effect of longitudinal changes in visceral fat area on incidence of metabolic risk factors: the Hitachi health study. *Obesity.(Silver.Spring)* **21**, 2126-2129.
- McEwen,B.S., de Leon,M.J., Lupien,S.J., & Meaney,M.J. (1999) Corticosteroids, the Aging Brain and Cognition. *Trends Endocrinol.Metab* **10**, 92-96.
- McGowan,P.O. & Szyf,M. (2010) Environmental epigenomics: understanding the effects of parental care on the epigenome. *Essays Biochem.* **48**, 275-287.
- McKinlay,S.M., Brambilla,D.J., & Posner,J.G. (1992) The normal menopause transition. *Maturitas* **14**, 103-115.
- Meier,C., Nguyen,T.V., Handelsman,D.J., Schindler,C., Kushnir,M.M., Rockwood,A.L., Meikle,A.W., Center,J.R., Eisman,J.A., & Seibel,M.J. (2008) Endogenous sex hormones and incident fracture risk in older men: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *Arch.Intern.Med.* **168**, 47-54.
- Melanson,K.J., Greenberg,A.S., Ludwig,D.S., Saltzman,E., Dallal,G.E., & Roberts,S.B. (1998) Blood glucose and hormonal responses to small and large meals in healthy young and older women. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **53**, B299-B305.
- Mena-Martin,F.J., Martin-Escudero,J.C., Simal-Blanco,F., Carretero-Ares,J.L., rzua-Mouronte,D., & Herreros-Fernandez,V. (2003) Health-related quality of life of subjects with known and unknown hypertension: results from the population-based Hortega study. *J.Hypertens.* **21**, 1283-1289.
- Miraglia del,G.E., Santoro,N., Cirillo,G., Raimondo,P., Grandone,A., D'Aniello,A., Di,N.M., & Perrone,L. (2004) Molecular screening of the ghrelin gene in Italian obese children: the Leu72Met variant is associated with an earlier onset of obesity. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **28**, 447-450.
- Monteleone,P., Serritella,C., Martiadis,V., Scognamiglio,P., & Maj,M. (2008) Plasma obestatin, ghrelin, and ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **93**, 4418-4421.
- Moon,M., Choi,J.G., Nam,D.W., Hong,H.S., Choi,Y.J., Oh,M.S., & Mook-Jung,I. (2011) Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid-beta1-42 oligomer-injected mice. *J.Alzheimers.Dis.* **23**, 147-159.
- Moreno,M., Chaves,J.F., Sancho-Bru,P., Ramalho,F., Ramalho,L.N., Mansego,M.L., Ivorra,C., Dominguez,M., Conde,L., Millan,C., Mari,M., Colmenero,J., Lozano,J.J., Jares,P., Vidal,J., Forns,X., Arroyo,V., Caballeria,J., Gines,P., & Bataller,R. (2010) Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans. *Hepatology* **51**, 974-985.

- Morley, J.E. (1998) Protein-energy malnutrition in older subjects. *Proc.Nutr.Soc.* **57**, 587-592.
- Morley, J.E. (2008) Sarcopenia: diagnosis and treatment. *J.Nutr.Health Aging* **12**, 452-456.
- Morley, J.E., Haren, M.T., Rolland, Y., & Kim, M.J. (2006) Frailty. *Med.Clin.North Am.* **90**, 837-847.
- Morley, J.E., Mooradian, A.D., Rosenthal, M.J., & Kaiser, F.E. (1987) Diabetes mellitus in elderly patients. Is it different? *Am.J.Med.* **83**, 533-544.
- Morrison, M.F., Redei, E., TenHave, T., Parmelee, P., Boyce, A.A., Sinha, P.S., & Katz, I.R. (2000) Dehydroepiandrosterone sulfate and psychiatric measures in a frail, elderly residential care population. *Biol.Psychiatry* **47**, 144-150.
- Mottillo, S., Fillion, K.B., Genest, J., Joseph, L., Pilote, L., Poirier, P., Rinfret, S., Schiffrin, E.L., & Eisenberg, M.J. (2010) The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J.Am.Coll.Cardiol.* **56**, 1113-1132.
- Muller, M., Grobbee, D.E., den, T., I, Lamberts, S.W., & van der Schouw, Y.T. (2005) Endogenous sex hormones and metabolic syndrome in aging men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **90**, 2618-2623.
- Munoz-Cruz, S., Togno-Pierce, C., & Morales-Montor, J. (2011) Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role. *Curr.Top.Med.Chem.* **11**, 1714-1727.
- Nagaraj, S., Peddha, M.S., & Manjappara, U.V. (2008) Fragments of obestatin as modulators of feed intake, circulating lipids, and stored fat. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **366**, 731-737.
- Nair, K.S., Rizza, R.A., O'Brien, P., Dhatariya, K., Short, K.R., Nehra, A., Vittone, J.L., Klee, G.G., Basu, A., Basu, R., Cobelli, C., Toffolo, G., Dalla, M.C., Tindall, D.J., Melton, L.J., III, Smith, G.E., Khosla, S., & Jensen, M.D. (2006) DHEA in elderly women and DHEA or testosterone in elderly men. *N.Engl.J.Med.* **355**, 1647-1659.
- Nakahara, T., Harada, T., Yasuhara, D., Shimada, N., Amitani, H., Sakoguchi, T., Kamiji, M.M., Asakawa, A., & Inui, A. (2008) Plasma obestatin concentrations are negatively correlated with body mass index, insulin resistance index, and plasma leptin concentrations in obesity and anorexia nervosa. *Biol.Psychiatry* **64**, 252-255.
- Nakamura, S., Yoshimura, M., Nakayama, M., Ito, T., Mizuno, Y., Harada, E., Sakamoto, T., Saito, Y., Nakao, K., Yasue, H., & Ogawa, H. (2004) Possible association of heart failure status with synthetic balance between aldosterone and dehydroepiandrosterone in human heart. *Circulation* **110**, 1787-1793.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., & Matsukura, S. (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**, 194-198.
- Nawata, H., Tanaka, S., Tanaka, S., Takayanagi, R., Sakai, Y., Yanase, T., Ikuyama, S., & Haji, M. (1995) Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in postmenopausal women. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **53**, 165-174.

nderwald-Stadler,M., Krebs,M., Promintzer,M., Mandl,M., Bischof,M.G., Nowotny,P., Kastenbauer,T., Luger,A., Prager,R., & Anderwald,C. (2007) Plasma obestatin is lower at fasting and not suppressed by insulin in insulin-resistant humans. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **293**, E1393-E1398.

Nogueiras,R., Pfluger,P., Tovar,S., Arnold,M., Mitchell,S., Morris,A., Perez-Tilve,D., Vazquez,M.J., Wiedmer,P., Castaneda,T.R., DiMarchi,R., Tschop,M., Schurmann,A., Joost,H.G., Williams,L.M., Langhans,W., & Dieguez,C. (2007) Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* **148**, 21-26.

O'Brien,J.T., Schweitzer,I., Ames,D., Tuckwell,V., & Mastwyk,M. (1994) Cortisol suppression by dexamethasone in the healthy elderly: effects of age, dexamethasone levels, and cognitive function. *Biol.Psychiatry* **36**, 389-394.

O'Donnell,A.B., Travison,T.G., Harris,S.S., Tenover,J.L., & McKinlay,J.B. (2006) Testosterone, dehydroepiandrosterone, and physical performance in older men: results from the Massachusetts Male Aging Study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **91**, 425-431.

Oberdoerffer,P. & Sinclair,D.A. (2007) The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **8**, 692-702.

Oh,J.Y., Barrett-Connor,E., Wedick,N.M., & Wingard,D.L. (2002) Endogenous sex hormones and the development of type 2 diabetes in older men and women: the Rancho Bernardo study. *Diabetes Care* **25**, 55-60.

Ohlsson,C., Labrie,F., Barrett-Connor,E., Karlsson,M.K., Ljunggren,O., Vandenput,L., Mellstrom,D., & Tivesten,A. (2010) Low serum levels of dehydroepiandrosterone sulfate predict all-cause and cardiovascular mortality in elderly Swedish men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **95**, 4406-4414.

Okazawa,T., Iwata,M., Matsushita,Y., Kamura,Y., Kato,H., Okazawa,S., Kigawa,M., & Tobe,K. (2013) Aging attenuates the association of central obesity with the accumulation of metabolic risk factors when assessed using the waist circumference measured at the umbilical level (the Japanese standard method). *Nutr.Diabetes* **3**, e96.

Pan,W., Tu,H., & Kastin,A.J. (2006) Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin. *Peptides* **27**, 911-916.

Panarelli,M., Holloway,C.D., Fraser,R., Connell,J.M., Ingram,M.C., Anderson,N.H., & Kenyon,C.J. (1998) Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **83**, 1846-1852.

Panjari,M. & Davis,S.R. (2010) DHEA for postmenopausal women: a review of the evidence. *Maturitas* **66**, 172-179.

Park,Y.W., Zhu,S., Palaniappan,L., Heshka,S., Carnethon,M.R., & Heymsfield,S.B. (2003) The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from

the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch.Intern.Med.* **163**, 427-436.

Penninx,B.W., Nicklas,B.J., Newman,A.B., Harris,T.B., Goodpaster,B.H., Satterfield,S., de,R.N., Yaffe,K., Pahor,M., & Kritchevsky,S.B. (2009) Metabolic syndrome and physical decline in older persons: results from the Health, Aging And Body Composition Study. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **64**, 96-102.

Percheron,G., Hogrel,J.Y., ot-Ledunois,S., Fayet,G., Forette,F., Baulieu,E.E., Fardeau,M., & Marini,J.F. (2003) Effect of 1-year oral administration of dehydroepiandrosterone to 60- to 80-year-old individuals on muscle function and cross-sectional area: a double-blind placebo-controlled trial. *Arch.Intern.Med.* **163**, 720-727.

Perls,T., Kunkel,L., & Puca,A. (2002) The genetics of aging. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **12**, 362-369.

Perticone,F., Sciacqua,A., Perticone,M., Laino,I., Miceli,S., Care',I., Galiano,L.G., Andreozzi,F., Maio,R., & Sesti,G. (2008) Low-plasma insulin-like growth factor-I levels are associated with impaired endothelium-dependent vasodilatation in a cohort of untreated, hypertensive Caucasian subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **93**, 2806-2810.

Pischon,T., Boeing,H., Hoffmann,K., Bergmann,M., Schulze,M.B., Overvad,K., van der Schouw,Y.T., Spencer,E., Moons,K.G., Tjonneland,A., Halkjaer,J., Jensen,M.K., Stegger,J., Clavel-Chapelon,F., Boutron-Ruault,M.C., Chajes,V., Linseisen,J., Kaaks,R., Trichopoulou,A., Trichopoulos,D., Bamia,C., Sieri,S., Palli,D., Tumino,R., Vineis,P., Panico,S., Peeters,P.H., May,A.M., Bueno-de-Mesquita,H.B., van Duijnhoven,F.J., Hallmans,G., Weinehall,L., Manjer,J., Hedblad,B., Lund,E., Agudo,A., Arriola,L., Barricarte,A., Navarro,C., Martinez,C., Quiros,J.R., Key,T., Bingham,S., Khaw,K.T., Boffetta,P., Jenab,M., Ferrari,P., & Riboli,E. (2008) General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N.Engl.J.Med.* **359**, 2105-2120.

Poehlman,E.T., Toth,M.J., & Gardner,A.W. (1995) Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study. *Ann.Intern.Med.* **123**, 673-675.

Poykko,S., Ukkola,O., Kauma,H., Savolainen,M.J., & Kesaniemi,Y.A. (2003a) Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for Type 2 diabetes and hypertension in a random sample of middle-aged subjects. *Diabetologia* **46**, 455-458.

Poykko,S.M., Kellokoski,E., Horkko,S., Kauma,H., Kesaniemi,Y.A., & Ukkola,O. (2003b) Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 2546-2553.

Poykko,S.M., Ukkola,O., Kauma,H., Kellokoski,E., Horkko,S., & Kesaniemi,Y.A. (2005) The negative association between plasma ghrelin and IGF-I is modified by obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia* **48**, 309-316.

Poynter,M.E. & Daynes,R.A. (1998) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J.Biol.Chem.* **273**, 32833-32841.

- Prado,C.M., Lieffers,J.R., McCargar,L.J., Reiman,T., Sawyer,M.B., Martin,L., & Baracos,V.E. (2008) Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *Lancet Oncol.* **9**, 629-635.
- Puig-Domingo,M., Serra-Prat,M., Merino,M.J., Pubill,M., Burdoy,E., & Papiol,M. (2008) Muscle strength in the Mataro aging study participants and its relationship to successful aging. *Aging Clin.Exp.Res.* **20**, 439-446.
- Pulkkinen,L., Ukkola,O., Kolehmainen,M., & Uusitupa,M. (2010) Ghrelin in diabetes and metabolic syndrome. *Int.J.Pept.* **2010**.
- Puts,M.T., Visser,M., Twisk,J.W., Deeg,D.J., & Lips,P. (2005) Endocrine and inflammatory markers as predictors of frailty. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **63**, 403-411.
- Qader,S.S., Hakanson,R., Rehfeld,J.F., Lundquist,I., & Salehi,A. (2008) Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul.Pept.* **146**, 230-237.
- Qi,X., Li,L., Yang,G., Liu,J., Li,K., Tang,Y., Liou,H., & Boden,G. (2007) Circulating obestatin levels in normal subjects and in patients with impaired glucose regulation and type 2 diabetes mellitus. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **66**, 593-597.
- Quik,E.H., Conemans,E.B., Valk,G.D., Kenemans,J.L., Koppeschaar,H.P., & Dam,P.S. (2010) Cognitive performance in older males is associated with growth hormone secretion. *Neurobiol.Aging*.
- Raffaitin,C., Gin,H., Empana,J.P., Helmer,C., Berr,C., Tzourio,C., Portet,F., Dartigues,J.F., Alperovitch,A., & Barberger-Gateau,P. (2009) Metabolic syndrome and risk for incident Alzheimer's disease or vascular dementia: the Three-City Study. *Diabetes Care* **32**, 169-174.
- Rajala,M.W. & Scherer,P.E. (2003) Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* **144**, 3765-3773.
- Ranganath,L., Sedgwick,I., Morgan,L., Wright,J., & Marks,V. (1998) The ageing entero-insular axis. *Diabetologia* **41**, 1309-1313.
- Rapp,S.R., Espeland,M.A., Shumaker,S.A., Henderson,V.W., Brunner,R.L., Manson,J.E., Gass,M.L., Stefanick,M.L., Lane,D.S., Hays,J., Johnson,K.C., Coker,L.H., Dailey,M., & Bowen,D. (2003) Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* **289**, 2663-2672.
- Ravaglia,G., Forti,P., Maioli,F., Bastagli,L., Chiappelli,M., Montesi,F., Bolondi,L., & Patterson,C. (2006) Metabolic Syndrome: prevalence and prediction of mortality in elderly individuals. *Diabetes Care* **29**, 2471-2476.

- Ravaglia,G., Forti,P., Maioli,F., Boschi,F., Bernardi,M., Pratelli,L., Pizzoferrato,A., & Gasbarrini,G. (1996) The relationship of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) to endocrine-metabolic parameters and functional status in the oldest-old. Results from an Italian study on healthy free-living over-ninety-year-olds. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **81**, 1173-1178.
- Ravaglia,G., Forti,P., Maioli,F., Boschi,F., Cicognani,A., Bernardi,M., Pratelli,L., Pizzoferrato,A., Porcu,S., & Gasbarrini,G. (1997) Determinants of functional status in healthy Italian nonagenarians and centenarians: a comprehensive functional assessment by the instruments of geriatric practice. *J.Am.Geriatr.Soc.* **45**, 1196-1202.
- Reiter,W.J., Schatzl,G., Mark,I., Zeiner,A., Pycha,A., & Marberger,M. (2001) Dehydroepiandrosterone in the treatment of erectile dysfunction in patients with different organic etiologies. *Urol.Res.* **29**, 278-281.
- Ren,A.J., Guo,Z.F., Wang,Y.K., Lin,L., Zheng,X., & Yuan,W.J. (2009a) Obestatin, obesity and diabetes. *Peptides* **30**, 439-444.
- Ren,A.J., He,Q., Shi,J.S., Guo,Z.F., Zheng,X., Lin,L., Wang,Y.K., Xia,S.Y., Sun,L.L., Du,X., Sun,Y., Zhang,L.M., & Yuan,W.J. (2009b) Association of obestatin with blood pressure in the third trimesters of pregnancy. *Peptides* **30**, 1742-1745.
- Resmini,E., Santos,A., Gomez-Anson,B., Lopez-Mourelo,O., Pires,P., Vives-Gilabert,Y., Crespo,I., Portella,M.J., De Juan-Delago,M., & Webb,S.M. (2013) Hippocampal dysfunction in cured Cushing's syndrome patients, detected by (1) H-MR-spectroscopy. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **79**, 700-707.
- Rietveld,I., Janssen,J.A., Hofman,A., Pols,H.A., van Duijn,C.M., & Lamberts,S.W. (2003) A polymorphism in the IGF-I gene influences the age-related decline in circulating total IGF-I levels. *Eur.J.Endocrinol.* **148**, 171-175.
- Rietveld,I., Janssen,J.A., van Rossum,E.F., Houwing-Duistermaat,J.J., Rivadeneira,F., Hofman,A., Pols,H.A., van Duijn,C.M., & Lamberts,S.W. (2004) A polymorphic CA repeat in the IGF-I gene is associated with gender-specific differences in body height, but has no effect on the secular trend in body height. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **61**, 195-203.
- Rigamonti,A.E., Pincelli,A.I., Corra,B., Viarengo,R., Bonomo,S.M., Galimberti,D., Scacchi,M., Scarpini,E., Cavagnini,F., & Muller,E.E. (2002) Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J.Endocrinol.* **175**, R1-R5.
- Riggs,B.L., Khosla,S., & Melton,L.J., III (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr.Rev.* **23**, 279-302.
- Roberts,S.B., Fuss,P., Heyman,M.B., & Young,V.R. (1995) Influence of age on energy requirements. *Am.J.Clin.Nutr.* **62**, 1053S-1058S.

Rodriguez,A., Gomez-Ambrosi,J., Catalan,V., Gil,M.J., Becerril,S., Sainz,N., Silva,C., Salvador,J., Colina,I., & Fruhbeck,G. (2009) Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int.J.Obes.(Lond)* **33**, 541-552.

Rodriguez,A., Gomez-Ambrosi,J., Catalan,V., Becerril,S., Sainz,N., Gil,M.J., Silva,C., Salvador,J., Barba, J., Colina,I., & Fruhbeck,G. (2010) Association of plasma acylated ghrelin with blood pressure and left ventricular mass in patients with metabolic syndrome. *J Hypertens.* **28(3)**:560-7.

Rolls,B.J., Dimeo,K.A., & Shide,D.J. (1995) Age-related impairments in the regulation of food intake. *Am.J.Clin.Nutr.* **62**, 923-931.

Romero,A., Kirchner,H., Heppner,K., Pfluger,P.T., Tschop,M.H., & Nogueiras,R. (2010) GOAT: the master switch for the ghrelin system? *Eur.J.Endocrinol.* **163**, 1-8.

Rosen,C.J. & Conover,C. (1997) Growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in aging: a summary of a National Institutes of Aging-Sponsored Symposium. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**, 3919-3922.

Rosen,T. & Bengtsson,B.A. (1990) Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet* **336**, 285-288.

Rosmond,R., Bouchard,C., & Bjorntorp,P. (2001) Tsp509I polymorphism in exon 2 of the glucocorticoid receptor gene in relation to obesity and cortisol secretion: cohort study. *BMJ* **322**, 652-653.

Rosmond,R., Chagnon,Y.C., Holm,G., Chagnon,M., Perusse,L., Lindell,K., Carlsson,B., Bouchard,C., & Bjorntorp,P. (2000) A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes.Res.* **8**, 211-218.

Rowe, J.W., Kahn, R.L. Successful aging. New York, NY: Pantheon Books; 1998.

Rueda,A.S., Serra-Prat,M., Fernandez,F.C., Palomera,E., & Puig,D.M. (2008) [Metabolic syndrome and cardiovascular disease in elders: results of the Mataro Ageing study]. *Med.Clin.(Barc.)* **130**, 327-331.

Russcher,H., Smit,P., van den Akker,E.L., van Rossum,E.F., Brinkmann,A.O., de Jong,F.H., Lamberts,S.W., & Koper,J.W. (2005a) Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **90**, 5804-5810.

Russcher,H., van Rossum,E.F., de Jong,F.H., Brinkmann,A.O., Lamberts,S.W., & Koper,J.W. (2005b) Increased expression of the glucocorticoid receptor-A translational isoform as a result of the ER22/23EK polymorphism. *Mol.Endocrinol.* **19**, 1687-1696.

- Samaras,N., Samaras,D., Frangos,E., Forster,A., & Philippe,J. (2013) A review of age-related dehydroepiandrosterone decline and its association with well-known geriatric syndromes: is treatment beneficial? *Rejuvenation.Res.* **16**, 285-294.
- Santos-Eggimann,B., Cuenoud,P., Spagnoli,J., & Junod,J. (2009) Prevalence of frailty in middle-aged and older community-dwelling Europeans living in 10 countries. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **64**, 675-681.
- Sapolsky,R.M., Krey,L.C., & McEwen,B.S. (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr.Rev.* **7**, 284-301.
- Sapolsky,R.M., Uno,H., Rebert,C.S., & Finch,C.E. (1990) Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J.Neurosci.* **10**, 2897-2902.
- Schaap,L.A., Pluijm,S.M., Smit,J.H., van Schoor,N.M., Visser,M., Gooren,L.J., & Lips,P. (2005) The association of sex hormone levels with poor mobility, low muscle strength and incidence of falls among older men and women. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **63**, 152-160.
- Schmid,C., Neidert,M.C., Tschopp,O., Sze,L., & Bernays,R.L. (2013) Growth hormone and Klotho. *J.Endocrinol.* **219**, R37-R57.
- Schoenhofen,E.A., Wyszynski,D.F., Andersen,S., Pennington,J., Young,R., Terry,D.F., & Perls,T.T. (2006) Characteristics of 32 supercentenarians. *J.Am.Geriatr.Soc.* **54**, 1237-1240.
- Schreiber,G. & Ziemer,M. (2008) The aging male--diagnosis and therapy of late-onset hypogonadism. *J.Dtsch.Dermatol.Ges.* **6**, 273-279.
- Schutte,A.E., Huisman,H.W., Schutte,R., van Rooyen,J.M., Malan,L., & Malan,N.T. (2007) Aging influences the level and functions of fasting plasma ghrelin levels: the POWIRS-Study. *Regul.Pept.* **139**, 65-71.
- Schutte,A.E., Huisman,H.W., van Rooyen,J.M., Malan,L., Malan,N.T., Fourie,C.M., Louw,R., van der Westhuizen,F.H., & Schutte,R. (2010) A significant decline in IGF-I may predispose young Africans to subsequent cardiometabolic vulnerability. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **95**, 2503-2507.
- Seeman,T.E., McEwen,B.S., Singer,B.H., Albert,M.S., & Rowe,J.W. (1997) Increase in urinary cortisol excretion and memory declines: MacArthur studies of successful aging. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**, 2458-2465.
- Seoane,L.M., Al-Massadi,O., Pazos,Y., Pagotto,U., & Casanueva,F.F. (2006) Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats. *J.Endocrinol.Invest* **29**, RC13-RC15.
- Serra-Prat,M., Alfaro,S.R., Palomera,E., Casamitjana,R., Buquet,X., Fernandez-Fernandez,C., & Puig-Domingo,M. (2009a) Relationship between ghrelin and the metabolic syndrome in the elderly: a longitudinal population-based study. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **70**, 227-232.

- Serra-Prat,M., Fernandez,X., Burdoy,E., Mussoll,J., Casamitjana,R., & Puig-Domingo,M. (2007) The role of ghrelin in the energy homeostasis of elderly people: a population-based study. *J.Endocrinol.Invest* **30**, 484-490.
- Serra-Prat,M., Palomera,E., Clave,P., & Puig-Domingo,M. (2009b) Effect of age and frailty on ghrelin and cholecystokinin responses to a meal test. *Am.J.Clin.Nutr.* **89**, 1410-1417.
- Serra-Prat,M., Palomera,E., Roca,M., & Puig-Domingo,M. (2010) Long-term effect of ghrelin on nutritional status and functional capacity in the elderly: a population-based cohort study. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **73**, 41-47.
- Shardell,M., D'Adamo,C., Alley,D.E., Miller,R.R., Hicks,G.E., Milaneschi,Y., Semba,R.D., Cherubini,A., Bandinelli,S., & Ferrucci,L. (2012) Serum 25-hydroxyvitamin D, transitions between frailty states, and mortality in older adults: the Invecchiare in Chianti Study. *J.Am.Geriatr.Soc.* **60**, 256-264.
- Sheriff,S., Kadeer,N., Joshi,R., Friend,L.A., James,J.H., & Balasubramaniam,A. (2012) Des-acyl ghrelin exhibits pro-anabolic and anti-catabolic effects on C2C12 myotubes exposed to cytokines and reduces burn-induced muscle proteolysis in rats 1. *Mol.Cell Endocrinol.* **351**, 286-295.
- Shibata,N., Ohnuma,T., Kuerban,B., Komatsu,M., & Arai,H. (2011) Genetic association between ghrelin polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *Dement.Geriatr.Cogn Disord.* **32**, 178-181.
- Shufelt,C., Bretsky,P., Almeida,C.M., Johnson,B.D., Shaw,L.J., Azziz,R., Braunstein,G.D., Pepine,C.J., Bittner,V., Vido,D.A., Stanczyk,F.Z., & Bairey Merz,C.N. (2010) DHEA-S levels and cardiovascular disease mortality in postmenopausal women: results from the National Institutes of Health--National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *J.Clin.Endocrinol.Metab* **95**, 4985-4992.
- Shumaker,S.A., Legault,C., Rapp,S.R., Thal,L., Wallace,R.B., Ockene,J.K., Hendrix,S.L., Jones,B.N., III, Assaf,A.R., Jackson,R.D., Kotchen,J.M., Wassertheil-Smoller,S., & Wactawski-Wende,J. (2003) Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* **289**, 2651-2662.
- Snijder,M.B., Zimmet,P.Z., Visser,M., Dekker,J.M., Seidell,J.C., & Shaw,J.E. (2004) Independent and opposite associations of waist and hip circumferences with diabetes, hypertension and dyslipidemia: the AusDiab Study. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **28**, 402-409.
- Sorensen,T.I., Boutin,P., Taylor,M.A., Larsen,L.H., Verdich,C., Petersen,L., Holst,C., Echwald,S.M., Dina,C., Toubro,S., Petersen,M., Polak,J., Clement,K., Martinez,J.A., Langin,D., Oppert,J.M., Stich,V., Macdonald,I., Arner,P., Saris,W.H., Pedersen,O., Astrup,A., & Froguel,P. (2006) Genetic polymorphisms and weight loss in obesity: a randomised trial of hypo-energetic high- versus low-fat diets. *PLoS.Clin.Trials* **1**, e12.

Soriguer,F., Goday,A., Bosch-Comas,A., Bordiu,E., Calle-Pascual,A., Carmena,R., Casamitjana,R., Castano,L., Castell,C., Catala,M., Delgado,E., Franch,J., Gaztambide,S., Girbes,J., Gomis,R., Gutierrez,G., Lopez-Alba,A., Martinez-Larrad,M.T., Menendez,E., Mora-Peces,I., Ortega,E., Pascual-Manich,G., Rojo-Martinez,G., Serrano-Rios,M., Valdes,S., Vazquez,J.A., & Vendrell,J. (2012) Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* **55**, 88-93.

Soules,M.R., Sherman,S., Parrott,E., Rebar,R., Santoro,N., Utian,W., & Woods,N. (2001) Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertil.Steril.* **76**, 874-878.

Spitznagel,M.B., Benitez,A., Updegraff,J., Potter,V., Alexander,T., Glickman,E., & Gunstad,J. (2010) Serum ghrelin is inversely associated with cognitive function in a sample of non-demented elderly. *Psychiatry Clin.Neurosci.* **64**, 608-611.

St-Pierre,D.H., Karelis,A.D., Coderre,L., Malita,F., Fontaine,J., Mignault,D., Brochu,M., Bastard,J.P., Cianflone,K., Doucet,E., Imbeault,P., & Rabasa-Lhoret,R. (2007) Association of acylated and nonacylated ghrelin with insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **92**, 264-269.

Steinle,N.I., Pollin,T.I., O'Connell,J.R., Mitchell,B.D., & Shuldiner,A.R. (2005) Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **90**, 6672-6677.

Stomati,M., Monteleone,P., Casarosa,E., Quirici,B., Puccetti,S., Bernardi,F., Genazzani,A.D., Rovati,L., Luisi,M., & Genazzani,A.R. (2000) Six-month oral dehydroepiandrosterone supplementation in early and late postmenopause. *Gynecol.Endocrinol.* **14**, 342-363.

Sturm,K., MacIntosh,C.G., Parker,B.A., Wishart,J., Horowitz,M., & Chapman,I.M. (2003) Appetite, food intake, and plasma concentrations of cholecystokinin, ghrelin, and other gastrointestinal hormones in undernourished older women and well-nourished young and older women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **88**, 3747-3755.

Sun,D.L., Wang,J.H., Jiang,B., Li,L.S., Li,L.S., Wu,L., Wu,H.Y., & He,Y. (2012) Metabolic syndrome vs. its components for prediction of cardiovascular mortality: A cohort study in Chinese elderly adults. *J.Geriatr.Cardiol.* **9**, 123-129.

Suzuki,M., Wright,L.S., Marwah,P., Lardy,H.A., & Svendsen,C.N. (2004) Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 3202-3207.

Tang,N.P., Wang,L.S., Yang,L., Gu,H.J., Zhu,H.J., Zhou,B., Sun,Q.M., Cong,R.H., & Wang,B. (2008a) Preproghrelin Leu72Met polymorphism in Chinese subjects with coronary artery disease and controls. *Clin.Chim.Acta* **387**, 42-47.

- Tang,S.Q., Jiang,Q.Y., Zhang,Y.L., Zhu,X.T., Shu,G., Gao,P., Feng,D.Y., Wang,X.Q., & Dong,X.Y. (2008b) Obestatin: its physicochemical characteristics and physiological functions. *Peptides* **29**, 639-645.
- Tchernof,A. & Labrie,F. (2004) Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies. *Eur.J.Endocrinol.* **151**, 1-14.
- Tenover,J.S. (1992) Effects of testosterone supplementation in the aging male. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **75**, 1092-1098.
- Tivesten,A., Vandenput,L., Labrie,F., Karlsson,M.K., Ljunggren,O., Mellstrom,D., & Ohlsson,C. (2009) Low serum testosterone and estradiol predict mortality in elderly men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **94**, 2482-2488.
- Tong,J., Prigeon,R.L., Davis,H.W., Bidlingmaier,M., Kahn,S.E., Cummings,D.E., Tschop,M.H., & D'Alessio,D. (2010) Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* **59**, 2145-2151.
- Traish,A.M., Kang,H.P., Saad,F., & Guay,A.T. (2011) Dehydroepiandrosterone (DHEA)--a precursor steroid or an active hormone in human physiology. *J.Sex Med.* **8**, 2960-2982.
- Trivedi,D.P. & Khaw,K.T. (2001) Dehydroepiandrosterone sulfate and mortality in elderly men and women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 4171-4177.
- Tschop,M., Weyer,C., Tataranni,P.A., Devanarayan,V., Ravussin,E., & Heiman,M.L. (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* **50**, 707-709.
- Ukkola,O. (2011) Ghrelin in Type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Mol.Cell Endocrinol.* **340**, 26-28.
- Ukkola,O. & Kesaniemi,Y.A. (2003) Preproghrelin Leu72Met polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J.Intern.Med.* **254**, 391-394.
- Ukkola,O., Poykko,S., Paivansalo,M., & Kesaniemi,Y.A. (2008) Interactions between ghrelin, leptin and IGF-I affect metabolic syndrome and early atherosclerosis. *Ann.Med.* **40**, 465-473.
- Ukkola,O., Poykko,S.M., & Antero,K.Y. (2006) Low plasma ghrelin concentration is an indicator of the metabolic syndrome. *Ann.Med.* **38**, 274-279.
- Ukkola,O., Ravussin,E., Jacobson,P., Perusse,L., Rankinen,T., Tschop,M., Heiman,M.L., Leon,A.S., Rao,D.C., Skinner,J.S., Wilmore,J.H., Sjostrom,L., & Bouchard,C. (2002) Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obes.Res.* **10**, 782-791.
- Ukkola,O., Ravussin,E., Jacobson,P., Snyder,E.E., Chagnon,M., Sjostrom,L., & Bouchard,C. (2001) Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 3996-3999.

- Uden,A.L., Elofsson,S., Knox,S., Lewitt,M.S., & Brismar,K. (2002) IGF-I in a normal population: relation to psychosocial factors. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **57**, 793-803.
- Unniappan,S., Speck,M., & Kieffer,T.J. (2008) Metabolic effects of chronic obestatin infusion in rats. *Peptides* **29**, 1354-1361.
- Vaessen,N., Heutink,P., Janssen,J.A., Witteman,J.C., Testers,L., Hofman,A., Lamberts,S.W., Oostra,B.A., Pols,H.A., & van Duijn,C.M. (2001) A polymorphism in the gene for IGF-I: functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction. *Diabetes* **50**, 637-642.
- Valenti,G. (2005) The pathway of partial androgen deficiency of aging male. *J.Endocrinol.Invest* **28**, 28-33.
- Valenti,G., Denti,L., Maggio,M., Ceda,G., Volpato,S., Bandinelli,S., Ceresini,G., Cappola,A., Guralnik,J.M., & Ferrucci,L. (2004) Effect of DHEAS on skeletal muscle over the life span: the InCHIANTI study. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **59**, 466-472.
- Valenti,G., Ferrucci,L., Lauretani,F., Ceresini,G., Bandinelli,S., Luci,M., Ceda,G., Maggio,M., & Schwartz,R.S. (2009) Dehydroepiandrosterone sulfate and cognitive function in the elderly: The InCHIANTI Study. *J.Endocrinol.Invest* **32**, 766-772.
- Van den Bekd, A. (2003) Hormonal determinants of successful aging in men. Tesis doctoral.
- van der Heide,L.P., Ramakers,G.M., & Smidt,M.P. (2006) Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog.Neurobiol.* **79**, 205-221.
- van der Lely,A.J., Tschop,M., Heiman,M.L., & Ghigo,E. (2004) Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr.Rev.* **25**, 426-457.
- van Rossum,E.F., de Jong,F.J., Koper,J.W., Uitterlinden,A.G., Prins,N.D., van Dijk,E.J., Koudstaal,P.J., Hofman,A., de Jong,F.H., Lamberts,S.W., & Breteler,M.M. (2008) Glucocorticoid receptor variant and risk of dementia and white matter lesions. *Neurobiol.Aging* **29**, 716-723.
- van Rossum,E.F., Feelders,R.A., van den Beld,A.W., Uitterlinden,A.G., Janssen,J.A., Ester,W., Brinkmann,A.O., Grobbee,D.E., de Jong,F.H., Pols,H.A., Koper,J.W., & Lamberts,S.W. (2004a) Association of the ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene with survival and C-reactive protein levels in elderly men. *Am.J.Med.* **117**, 158-162.
- van Rossum,E.F., Koper,J.W., Huizenga,N.A., Uitterlinden,A.G., Janssen,J.A., Brinkmann,A.O., Grobbee,D.E., de Jong,F.H., van Duyn,C.M., Pols,H.A., & Lamberts,S.W. (2002) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* **51**, 3128-3134.
- van Rossum,E.F. & Lamberts,S.W. (2004) Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog.Horm.Res.* **59**, 333-357.

- van Rossum,E.F., Voorhoeve,P.G., te Velde,S.J., Koper,J.W., Delemarre-van de Waal HA, Kemper,H.C., & Lamberts,S.W. (2004b) The ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with a beneficial body composition and muscle strength in young adults. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **89**, 4004-4009.
- van Wieringen,J.C., Roede,M.J., & Wit,J.M. (1985) [Growth diagrams for patient care]. *Tijdschr.Kindergeneeskd.* **53**, 147-152.
- Varela,L., Vazquez,M.J., Cordido,F., Nogueiras,R., Vidal-Puig,A., Dieguez,C., & Lopez,M. (2011) Ghrelin and lipid metabolism: key partners in energy balance. *J.Mol.Endocrinol.* **46**, R43-R63.
- Vartiainen,J., Kesaniemi,Y.A., & Ukkola,O. (2006) Sequencing analysis of ghrelin gene 5' flanking region: relations between the sequence variants, fasting plasma total ghrelin concentrations, and body mass index. *Metabolism* **55**, 1420-1425.
- Veldhuis,J.D. (1997) Altered pulsatile and coordinate secretion of pituitary hormones in aging: evidence of feedback disruption. *Aging (Milano.)* **9**, 19-20.
- Veldhuis,J.D., Iranmanesh,A., Ho,K.K., Waters,M.J., Johnson,M.L., & Lizarralde,G. (1991) Dual defects in pulsatile growth hormone secretion and clearance subserve the hyposomatotropism of obesity in man. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **72**, 51-59.
- Veldhuis,J.D., Liem,A.Y., South,S., Weltman,A., Weltman,J., Clemmons,D.A., Abbott,R., Mulligan,T., Johnson,M.L., Pincus,S., & . (1995) Differential impact of age, sex steroid hormones, and obesity on basal versus pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **80**, 3209-3222.
- Veldhuis,J.D., Sharma,A., & Roelfsema,F. (2013) Age-dependent and gender-dependent regulation of hypothalamic-adrenocorticotrophic-adrenal axis. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* **42**, 201-225.
- Vermeulen,A. (1987) Nyctohemeral growth hormone profiles in young and aged men: correlation with somatomedin-C levels. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **64**, 884-888.
- Vermeulen,A. (1991) Clinical review 24: Androgens in the aging male. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **73**, 221-224.
- Vicennati,V., Genghini,S., De,I.R., Pasqui,F., Pagotto,U., & Pasquali,R. (2007) Circulating obestatin levels and the ghrelin/obestatin ratio in obese women. *Eur.J.Endocrinol.* **157**, 295-301.
- Vieira,D.C., Tibana,R.A., Tajra,V., Nascimento,D.C., De Farias,D.L., Silva,A.O., Teixeira,T.G., Fonseca,R.M., de Oliveira,R.J., Mendes,F.A., Martins,W.R., Funghetto,S.S., Karnikowski,M.G., Navalta,J.W., & Prestes,J. (2013) Decreased functional capacity and muscle strength in elderly women with metabolic syndrome. *Clin.Interv.Aging* **8**, 1377-1386.
- Vijg,J. (2000) Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutat.Res.* **447**, 117-135.

Vijg,J. (2014) Somatic mutations, genome mosaicism, cancer and aging. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **26**, 141-149.

Vitale,G., Brugts,M.P., Ogliari,G., Castaldi,D., Fatti,L.M., Varewijck,A.J., Lamberts,S.W., Monti,D., Bucci,L., Cevenini,E., Cavagnini,F., Franceschi,C., Hofland,L.J., Mari,D., & Janssen,J. (2012) Low circulating IGF-I bioactivity is associated with human longevity: findings in centenarians' offspring. *Aging (Albany.NY)* **4**, 580-589.

Vivenza,D., Rapa,A., Castellino,N., Bellone,S., Petri,A., Vacca,G., Aimaretti,G., Broglio,F., & Bona,G. (2004) Ghrelin gene polymorphisms and ghrelin, insulin, IGF-I, leptin and anthropometric data in children and adolescents. *Eur.J.Endocrinol.* **151**, 127-133.

Wallace,D.C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu.Rev.Genet.* **39**, 359-407.

Walston,J., Hadley,E.C., Ferrucci,L., Guralnik,J.M., Newman,A.B., Studenski,S.A., Ershler,W.B., Harris,T., & Fried,L.P. (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**, 991-1001.

Wang,C., Eyre,D.R., Clark,R., Kleinberg,D., Newman,C., Iranmanesh,A., Veldhuis,J., Dudley,R.E., Berman,N., Davidson,T., Barstow,T.J., Sinow,R., Alexander,G., & Swerdloff,R.S. (1996) Sublingual testosterone replacement improves muscle mass and strength, decreases bone resorption, and increases bone formation markers in hypogonadal men--a clinical research center study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **81**, 3654-3662.

Wang,J., Ruotsalainen,S., Moilanen,L., Lepisto,P., Laakso,M., & Kuusisto,J. (2007a) The metabolic syndrome predicts cardiovascular mortality: a 13-year follow-up study in elderly non-diabetic Finns. *Eur.Heart J.* **28**, 857-864.

Wang,K., Wang,L., Zhao,Y., Shi,Y., Wang,L., & Chen,Z.J. (2009) No association of the Arg51Gln and Leu72Met polymorphisms of the ghrelin gene and polycystic ovary syndrome. *Hum.Reprod.* **24**, 485-490.

Wang,L., Hao,Q., Wang,Y.D., Wang,W.J., & Li,D.J. (2011) Protective effects of dehydroepiandrosterone on atherosclerosis in ovariectomized rabbits via alleviating inflammatory injury in endothelial cells. *Atherosclerosis* **214**, 47-57.

Wang,L., Wang,Y.D., Wang,W.J., Zhu,Y., & Li,D.J. (2007b) Dehydroepiandrosterone improves murine osteoblast growth and bone tissue morphometry via mitogen-activated protein kinase signaling pathway independent of either androgen receptor or estrogen receptor. *J.Mol.Endocrinol.* **38**, 467-479.

Ward,M.A., Carlsson,C.M., Trivedi,M.A., Sager,M.A., & Johnson,S.C. (2005) The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. *BMC.Neurol.* **5**, 23.

- Webb,S.M. & Puig-Domingo,M. (1995) Role of melatonin in health and disease. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **42**, 221-234.
- West,C.A., Arnett,T.R., & Farrow,S.M. (1996) Expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA variants in rat bone. *Bone* **19**, 41-46.
- West,N.A. & Haan,M.N. (2009) Body adiposity in late life and risk of dementia or cognitive impairment in a longitudinal community-based study. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **64**, 103-109.
- Whitmer,R.A., Gunderson,E.P., Barrett-Connor,E., Quesenberry,C.P., Jr., & Yaffe,K. (2005) Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *BMJ* **330**, 1360.
- Wilson,P.W., Kannel,W.B., Silbershatz,H., & D'Agostino,R.B. (1999) Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. *Arch.Intern.Med.* **159**, 1104-1109.
- Wise,P.M., Krajinak,K.M., & Kashon,M.L. (1996) Menopause: the aging of multiple pacemakers. *Science* **273**, 67-70.
- Wortley,K.E., Anderson,K.D., Garcia,K., Murray,J.D., Malinova,L., Liu,R., Moncrieffe,M., Thabet,K., Cox,H.J., Yancopoulos,G.D., Wiegand,S.J., & Sleeman,M.W. (2004) Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 8227-8232.
- Wu,F.C., Tajar,A., Beynon,J.M., Pye,S.R., Silman,A.J., Finn,J.D., O'Neill,T.W., Bartfai,G., Casanueva,F.F., Forti,G., Giwercman,A., Han,T.S., Kula,K., Lean,M.E., Pendleton,N., Punab,M., Boonen,S., Vanderschueren,D., Labrie,F., & Huhtaniemi,I.T. (2010) Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N.Engl.J.Med.* **363**, 123-135.
- Xu,L.L., Xiang,H.D., Qiu,C.C., & Xu,Q. (2008) Association of ghrelin polymorphisms with metabolic syndrome in Han Nationality Chinese. *Biomed. Environ. Sci.* **21**, 188-192.
- Yaffe,K., Weston,A.L., Blackwell,T., & Krueger,K.A. (2009) The metabolic syndrome and development of cognitive impairment among older women. *Arch.Neurol.* **66**, 324-328.
- Yang,N., Liu,X., Ding,E.L., Xu,M., Wu,S., Liu,L., Sun,X., & Hu,F.B. (2009) Impaired ghrelin response after high-fat meals is associated with decreased satiety in obese and lean Chinese young adults. *J.Nutr.* **139**, 1286-1291.
- Yarnell,J.W., Beswick,A.D., Sweetnam,P.M., & Riad-Fahmy,D. (1993) Endogenous sex hormones and ischemic heart disease in men. The Caerphilly prospective study. *Arterioscler.Thromb.* **13**, 517-520.
- Yazdanpanah,M., Sayed-Tabatabaei,F.A., Janssen,J.A., Rietveld,I., Hofman,A., Stijnen,T., Pols,H.A., Lamberts,S.W., Witteman,J.C., & van Duijn,C.M. (2006) IGF-I gene promoter polymorphism is a predictor of survival after myocardial infarction in patients with type 2 diabetes. *Eur.J.Endocrinol.* **155**, 751-756.

- Yildiz,B.O., Suchard,M.A., Wong,M.L., McCann,S.M., & Licinio,J. (2004) Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 10434-10439.
- Yokoyama,H., Hirose,H., Kawabe,H., & Saito,I. (2009) Characteristics of reference intervals of metabolic factors in healthy Japanese: a proposal to set generation- and gender-specific diagnostic criteria for metabolic syndrome. *J.Atheroscler.Thromb.* **16**, 113-120.
- Yoshida,S., Aihara,K., Azuma,H., Uemoto,R., Sumitomo-Ueda,Y., Yagi,S., Ikeda,Y., Iwase,T., Nishio,S., Kawano,H., Miki,J., Yamada,H., Hirata,Y., Akaike,M., Sata,M., & Matsumoto,T. (2010) Dehydroepiandrosterone sulfate is inversely associated with sex-dependent diverse carotid atherosclerosis regardless of endothelial function. *Atherosclerosis* **212**, 310-315.
- Yudkin,J.S., Stehouwer,C.D., Emeis,J.J., & Coppack,S.W. (1999) C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **19**, 972-978.
- Zambon,S., Zanoni,S., Romanato,G., Corti,M.C., Noale,M., Sartori,L., Musacchio,E., Baggio,G., Crepaldi,G., & Manzato,E. (2009) Metabolic syndrome and all-cause and cardiovascular mortality in an Italian elderly population: the Progetto Veneto Anziani (Pro.V.A.) Study. *Diabetes Care* **32**, 153-159.
- Zamboni,M., Zoico,E., Fantin,F., Panourgia,M.P., Di,F., V, Tosoni,P., Solerte,B., Vettor,R., & Bosello,O. (2004) Relation between leptin and the metabolic syndrome in elderly women. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **59**, 396-400.
- Zavarella,S., Petrone,A., Zampetti,S., Gueorguiev,M., Spoletini,M., Mein,C.A., Leto,G., Korbonits,M., & Buzzetti,R. (2008) A new variation in the promoter region, the -604 C>T, and the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene are associated with protection to insulin resistance. *Int.J.Obes.(Lond)* **32**, 663-668.
- Zecevic,M., Amos,C.I., Gu,X., Campos,I.M., Jones,J.S., Lynch,P.M., Rodriguez-Bigas,M.A., & Frazier,M.L. (2006) IGF1 gene polymorphism and risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **98**, 139-143.
- Zhang,C., Rexrode,K.M., van Dam,R.M., Li,T.Y., & Hu,F.B. (2008) Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: sixteen years of follow-up in US women. *Circulation* **117**, 1658-1667.
- Zhang,J.V., Ren,P.G., vsian-Kretchmer,O., Luo,C.W., Rauch,R., Klein,C., & Hsueh,A.J. (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* **310**, 996-999.
- Zhu,J.F., Liang,L., Zou,C.C., & Fu,J.F. (2010) Plasma ghrelin levels and polymorphisms of ghrelin gene in Chinese obese children and adolescents. *Ir.J.Med.Sci.* **179**, 345-349.

Zizzari,P., Longchamps,R., Epelbaum,J., & Bluet-Pajot,M.T. (2007) Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* **148**, 1648-1653.