



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario Oncológico del Principado de Asturias

Programa de Doctorado "Investigación en Cáncer"

**Cambios de metilación e hidroximetilación del ADN
durante el envejecimiento de células madre
mesenquimales humanas**

**Tesis Doctoral
Estela García Torano
Diciembre 2015**



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario Oncológico del Principado de Asturias

Programa de Doctorado “Investigación en Cáncer”

Cambios de metilación e hidroximetilación del ADN durante el envejecimiento de células madre mesenquimales humanas

Tesis Doctoral

Estela García Torano
Autora

Mario F. Fraga
Director

Agustín F. Fernández
Director



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Cambios de metilación e hidroximetilación del ADN durante el envejecimiento de células madre mesenquimales humanas.	Inglés: DNA methylation and hydroxymethylation changes during aging in human mesenchymal stem cells
2.- Autor	
Nombre: Estela García Toraño	DNI/PNIE:
Programa de Doctorado: Investigación en Cáncer	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

La metilación del ADN genómico en la posición 5 de la citosina (5mC) es el mecanismo epigenético más estudiado y está involucrada en numerosos procesos celulares, como la organización de la cromatina, la impronta genómica, inactivación del cromosoma X y la regulación de la expresión génica, entre otros. Las alteraciones en los patrones de metilación del ADN están relacionadas con el desarrollo de numerosas enfermedades, incluido el cáncer. Además, varios estudios han propuesto que también pueden jugar un papel importante en el envejecimiento y en la predisposición de enfermedades relacionadas con la edad. Por otra parte, el reciente descubrimiento de la 5-hidroximetilcitosina (5hmC), y el hecho de que una parte de la metilación del ADN, que asumía que se trataba en su totalidad de 5mC, se trata en realidad de 5hmC, sugiere que esta marca epigenética deba tenerse también en cuenta en futuros estudios de metilación.

El envejecimiento se caracteriza por una pérdida de funciones corporales acompañado por una degeneración general de células y tejidos. En este contexto, el deterioro y la pérdida de respuesta al daño que tienen lugar a lo largo de la vida en células no terminalmente diferenciadas, como las células madre adultas, jugarían un papel crucial en el proceso de declive celular y tisular durante el envejecimiento.

Esta tesis doctoral tiene como propósito describir los cambios de metilación e hidroximetilación del ADN que tienen lugar a lo largo de la vida de células madre mesenquimales, su relación entre sí y su asociación con las diferentes marcas post-traduccionales de histonas. Para ello, en primer lugar estudiamos los cambios de metilación del ADN en 34 muestras obtenidas de individuos de edades comprendidas entre 2 y 91 años mediante la plataforma *Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit 450 (Illumina Inc)*. Mediante esta tecnología de *microarray*, identificamos 18735 sitios CpG hipermetilados y 45407 hipometilados con la edad. Estos cambios de metilación son, en su mayoría, dependientes del tipo celular ya que sólo una pequeña parte de los cambios es común a otros tipos celulares.

Mientras que la ganancia de metilación durante el envejecimiento está asociada a las marcas represivas de histonas H3K27me3 y H3k9me3, la hipometilación del ADN está relacionada con la marca de activación H3K4me1 en MSCs. Ambas



asociaciones tienen también lugar también en células diferenciadas, lo que sugiere que estas marcas de histonas están asociadas a los cambios de metilación durante el envejecimiento independientemente del tipo celular. Además, el hecho de que la H3k4me1 haya sido recientemente relacionada en estudios previos con *enhancers*, sugiere que, H3k4me1 e hipometilación del ADN, podrían estar implicadas en los cambios de la regulación de expresión génica que tiene lugar durante el envejecimiento.

Además de los cambios de metilación del ADN durante el transcurso de la vida, en esta tesis se describen los patrones de 5hmC en MSCs y los cambios que tienen lugar en individuos de avanzada edad. Para ello, estudiamos los perfiles de 5hmC en 17 muestras obtenidas de individuos de edades comprendidas entre 2 y 89 años, nuevamente, a través de la plataforma *Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit 450 (Illumina Inc)*. Los análisis permitieron identificar 10685 sitios CpG frecuentemente hidroximetilados en células madre mesenquimales que estaban enriquecidos en regiones de baja densidad de CpGs, intrones y regiones intergénicas, y en *enhancers* asociados a la marca de histonas H3K4me1. Estos resultados están en línea con trabajos anteriores tanto de células madre embrionarias, como de células terminalmente diferenciadas.

Un análisis posterior de los datos permitió identificar 1595 sitios CpG diferencialmente hidroximetilados con la edad. De ellos, 749 se hiperhidroximetilaban y 846 hipohidroximetilaban en individuos de avanzada edad. Al comparar los datos de 5hmC con los cambios de 5mC con la edad, se encontró que el aumento de 5hmC asociado a la edad ocurre frecuentemente en regiones que pierden metilación en personas de avanzada edad, en línea con lo descrito en otros trabajos, lo que sugiere que la 5hmC podría jugar un papel en los cambios de metilación del ADN que tienen lugar durante el envejecimiento.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se ha puesto a punto el desarrollo de una técnica que permite el análisis de la 5hmC mediante la pirosecuenciación del ADN en regiones específicas, la cual permitirá, en estudios futuros, el análisis de los patrones de 5hmC de una forma región-específica, lo que ayudará a esclarecer el papel funcional de la 5hmC en el ADN y su implicación en los diferentes procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, el envejecimiento y el desarrollo de diferentes enfermedades, incluido el cáncer.

RESUMEN (en Inglés)

DNA methylation is one of the best-known epigenetic modifications in mammals. It is an important epigenetic mark involved in gene expression, X chromosome and transposon inactivation, and genomic imprinting, among others. Alterations of DNA methylation patterns are related to many diseases, including cancer. Moreover, it is well known that genomic DNA methylation is modified during the lifetime of higher organisms, and this variation has been regularly ascribed to the epigenetic mark 5-methylcytosine. However, the recent discovery of the presence of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) in DNA implies that this epigenetic mark must be taken into account in studies of DNA methylation and aging.

Aging is defined as the time-dependent functional decline characterized by a



progressive loss of physiological integrity, accompanied by loss of functionality of cells and tissues. Throughout life, adult stem cells are subject to the environmental stresses and intracellular damages and could play an important role in the aging process.

The work presented in this Thesis concerns the description of DNA methylation and hydroxymethylation changes during aging in MSCs, the relationship between both epigenetic marks, and the possible association between these changes and the chromatin marks.

DNA methylation profiling of mesenchymal stem cells obtained from 34 bone marrow donors, aged 2 to 92, identified 18735 hypermethylated and 45407 hypomethylated CpG sites associated with aging. Interestingly, cell type seems to play an important role in the regulation of DNA methylation changes over time since many of the sequences were not common to different tissues.

As in differentiated cells, hypermethylated sequences in MSCs were enriched in the the chromatin repressive marks H3K9me3 and H3K27me3. Moreover, hypomethylated CpG sites were highly enriched in the active chromatin mark H3K4me1 in MSCs and differentiated cells, suggesting this is a cell type independent chromatin signature of DNA hypomethylation during aging. Interestingly, H3K4me1 has recently been associated with enhancers, which suggests that H3K4me1-associated DNA hypomethylation could play a role in the changes of gene expression during aging.

Besides, we analyzed the genome-wide profile of 5hmC in MSCs obtained from 17 bone marrow donors, aged 2 to 89 years. We identified 10685 frequently hydroxymethylated CpG sites in MSCs that were significantly associated with low density CpG regions, introns, the histone posttranslational modification H3K4me1 and enhancers, in line with previous studies carried out in other cell types.

Study of the age-associated changes to 5hmC identified 785 hyper- and 846 hypohydroxymethylated CpG sites in the MSCs obtained from older individuals. Interestingly, DNA hyperhydroxymethylation in the advanced-age group was associated with loss of 5-methylcytosine, which suggests that this epigenetic modification plays a role in changes in genomic DNA methylation during lifetime.

During the course of this work we have developed a protocol optimization technique that is applicable to analyze 5hmC through bisulfite pyrosequencing approached. This method allows site-specific DNA hydroxymethylation analysis, and will help to elucidate the functional role of 5hmC in the different biological process, such as cell differentiation, development, aging and disease in future projects.

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias al disfrute de una Ayuda Predoctoral para la formación en investigación y docencia del Principado de Asturias del programa Severo Ochoa (FICYT, BP11-138).

El trabajo experimental ha sido financiado por los proyectos de la Consejería de Economía y Empleo del Principado de Asturias (GRUPIN14-052) y el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministerio de Sanidad y Consumo (PPI12/01080).

Índice

Abreviaturas	7
Abstract	13
Resumen	17
1. Introducción	21
1.1 Mecanismos epigenéticos	23
1.1.1 Conformación de la cromatina	24
1.1.2 Metilación del ADN	25
1.1.3 Hidroximetilación del ADN	27
1.1.4 Modificaciones post-traduccionales de las histonas	30
1.1.5 Complejos Polycomb y Tritórax	32
1.1.6 Proteínas con dominios de unión al ADN metilado	33
1.2 Epigenética y enfermedades	34
1.3 Epigenética y envejecimiento	35
1.3.1 Cambios de metilación del ADN durante el envejecimiento	37
1.3.2 Factores ambientales durante el envejecimiento	39
1.3.3 Epigenética de enfermedades asociadas al envejecimiento	43
1.3.3.1 Alzéimer.....	43
1.3.3.2 Diabetes Tipo-2.....	43
1.3.3.3 Enfermedades cardiovasculares	44
1.4 Células Madre adultas	44
1.4.1 Envejecimiento en células madre adultas	46
2. Objetivos	49
3. Materiales y métodos	53
3.1 Materiales	55
3.1.1 Obtención y cultivo de células madre mesenquimales	57
3.2 Métodos	58
3.2.1 Extracción de ADN genómico	58
3.2.2 Análisis de metilación del ADN (mC) a nivel de locus específico	58
3.2.2.1 Fundamento del análisis.....	58
3.2.2.2 Análisis de metilación del ADN mediante <i>Arrays</i>	59
3.2.2.3 Análisis de metilación del ADN por pirosecuenciación de bisulfito	60

3.2.3	Análisis de la hidroximetilación del ADN (5hmC) a nivel de locus específico	62
3.2.3.1	Fundamento del análisis.....	62
3.2.3.2	Análisis de 5hmC mediante <i>Arrays</i>	63
3.2.3.3	Análisis de 5hmC del ADN por pirosecuenciación de bisulfito	63
3.2.3.3.1	Purificación del ADN con perlas magnéticas.....	64
3.2.3.3.2	Reacción de Oxidación y modificación de bisulfito	64
3.2.3.3.3	Análisis por pirosecuenciación	65
3.2.4	Análisis informático	67
3.2.4.1	Base de datos de metilación del ADN de de cerebro y sangre.....	67
3.2.4.2	Preprocesado de datos obtenidos del array de metilación.....	67
3.2.4.3	Cálculo de los niveles de 5hmC e identificación de sondas frecuentemente hidroximetiladas.....	68
3.2.4.4	Identificación de sondas diferencialmente metiladas e hidroximetiladas	68
3.2.4.5	Análisis de enriquecimiento de marcas específicas de histonas... ..	68
3.2.4.6	Análisis de enriquecimiento de segmentos cromatínicos	69
3.2.4.7	Análisis de región genómica donde se localizan las sondas	70
3.2.4.8	Análisis de estado de islas CpG donde se localizan las sondas.....	70
3.2.4.9	Análisis de densidad de CpGs donde se localizan las sondas	70
3.2.4.10	Análisis de distancias de las sondas respecto a telómeros y centrómeros	71
4.	Resultados	73
	<i>Parte I</i>	75
4.1	Cambios de metilación del ADN en mesenquimales	75
4.1.1	Cambios de metilación del ADN durante el envejecimiento en MSCs.....	75
4.1.2	Caracterización de las dmCpGs desde el punto de vista genómico-funcional	77
4.1.2.1	Densidad de los sitios dmCpGs.....	78
4.1.2.2	Localización cromosómica de los sitios dmCpGs.....	78
4.1.2.3	Localización genómica de las dmCpGs	79
4.1.3	Cambios comunes de metilación a otros tipos de tejido	80
4.1.4	Asociación de las dmCpGs con marcas de la cromatina	81
	<i>Parte II</i>	84

4.2 Estudio de la 5hmC en MSCs.....	84
4.2.1 Distribución genómica de 5hmC en células madre mesenquimales..	84
4.2.1.1 Densidad de CpGs de los sitios FhmC.....	85
4.2.1.2 Localización cromosómica de los sitios FhmC.....	86
4.2.1.3 Localización genómica de las FhmC.....	86
4.2.2 Asociación de los sitios FhmC con la cromatina.....	87
4.2.3 Cambios de 5-hidroximetilcitosina durante el envejecimiento en MSCs.....	89
4.2.4 Caracterización de las dhmCs desde el punto de vista genómico-funcional.....	91
4.2.4.1 Densidad de CpGs de los sitios dhmCs.....	91
4.2.4.2 Localización cromosómica de los sitios dhmCs.....	91
4.2.4.3 Localización genómica de los sitios dhmCs.....	92
4.2.5 Relación entre los cambios de 5mC y 5hmC.....	93
4.2.6 Asociación de los sitios dhmCs con la cromatina.....	94
5. Discusión.....	97
6. Conclusiones.....	109
7. Bibliografía.....	113

Abreviaturas

5caC	5-carbonilcitosina
5fC	5-formilcitosina
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5mC	5-metilcitosina
APS	Adenosina-5'-fosfosulfato
ATP	Adenosin trifosfato
BPA	Bisfenol A
BS	Modificación de bisulfito
ChIP-seq	Inmunoprecipitación de la cromatina seguida de ultrasecuenciación
CpG	Dinucleótido citosina-guanina
D	Delta de <i>Cliff</i>
d5hmC	Sitios CpG diferencialmente hidroximetilados
d5mC	Sitios CpGs diferencialmente 5-metilados
dC	Desoxicitidina
DES	Dietilestilbestrol
dmCpG	Sitios CpG diferencialmente metilados
DMEM	Medio mínimo esencial Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DNMTs	Metiltransferasas del ADN
dNTPs	deoxi-nucleótidos trifosfato
ESCs	Células madre embrionarias (<i>Embryonic Stem Cells</i>)
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FhmC	Sitios frecuentemente hidroximetilados
H3k27ac	Acetilación de la lisina 27 de la histona H3
H3k27me3	Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3

H3k4me1/2/3	Metilación de la lisina 4 de la histona H3
H3k9me3	Trimetilación de la lisina 9 de la histona H3
H4k16ac	Acetilación de la lisina 16 en la histona H4
HAND2	<i>Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2</i>
HATs	Histona acetil transferasas
HDACs	Histona desacetilasas
hiper5hmC	Sitios CpG hiperhidroximetilados con la edad
hipermC	Sitios CpG hipermetilados con la edad
hipo5hmC	Sitios CpG hipohidroximetilados con la edad
hipomC	Sitios CpG hipometilados con la edad
HOXA11	<i>Homeobox A11</i>
KCNQ1	<i>Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q, Member 1</i>
LCC	Líneas celulares de cáncer de colon
MBD	Dominios de unión al ADN metilado (<i>Methyl Binding Domain</i>)
mC	metilcitosina
mC	Metilcitosina
MSCs	Células madre mesenquimales (<i>Mesenchymal Stem Cells</i>)
OR	<i>Odds ratio</i>
oxBS	Oxidación y posterior modificación de bisulfito
PITX2	<i>Paired-Like Homeodomain 2</i>
PPi	Pirofosfato
SAM	S-adenosil-metionina
SFB	Suero fetal bovino
SIX2	<i>SIX Homeobox 2</i>
TBX15	<i>T-Box 15</i>

TET	<i>Ten Eleven Traslocation</i>
VWA2	<i>Von Willebrand Factor A Domain Containing 2</i>
α KG	α -cetogluturato
β	Valor beta
$\Delta\beta$	Diferencia de los valores β entre las modificaciones BS y oxBS

Abstract

DNA methylation is one of the best-known epigenetic modifications in mammals. It is an important epigenetic mark involved in gene expression, X chromosome and transposon inactivation, and genomic imprinting, among others. Alterations of DNA methylation patterns are related to many diseases, including cancer. Moreover, it is well known that genomic DNA methylation is modified during the lifetime of higher organisms, and this variation has been regularly ascribed to the epigenetic mark 5-methylcytosine. However, the recent discovery of the presence of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) in DNA implies that this epigenetic mark must be taken into account in studies of DNA methylation and aging.

Aging is defined as the time-dependent functional decline characterized by a progressive loss of physiological integrity, accompanied by loss of functionality of cells and tissues. Throughout life, adult stem cells are subject to the environmental stresses and intracellular damages and could play an important role in the aging process.

The work presented in this Thesis concerns the description of DNA methylation and hydroxymethylation changes during aging in MSCs, the relationship between both epigenetic marks, and the possible association between these changes and the chromatin marks.

DNA methylation profiling of mesenchymal stem cells obtained from 34 bone marrow donors, aged 2 to 92, identified 18735 hypermethylated and 45407 hypomethylated CpG sites associated with aging. Interestingly, cell type seems to play an important role in the regulation of DNA methylation changes over time since many of the sequences were not common to different tissues.

As in differentiated cells, hypermethylated sequences in MSCs were enriched in the the chromatin repressive marks H3K9me3 and H3K27me3. Moreover, hypomethylated CpG sites were highly enriched in the active chromatin mark H3K4me1 in MSCs and differentiated cells, suggesting this is a cell type independent chromatin signature of DNA hypomethylation during aging. Interestingly, H3K4me1 has recently been associated with enhancers, which suggests that H3K4me1-associated DNA hypomethylation could play a role in the changes of gene expression during aging.

Besides, we analyzed the genome-wide profile of 5hmc in MSCs obtained from 17 bone marrow donors, aged 2 to 89 years. We identified 10685 frequently hydroxymethylated CpG sites in MSCs that were significantly associated with low

density CpG regions, introns, the histone posttranslational modification H3k4me1 and enhancers, in line with previous studies carried out in other cell types.

Study of the age-associated changes to 5hmC identified 785 hyper- and 846 hypohydroxymethylated CpG sites in the MSCs obtained from older individuals. Interestingly, DNA hyperhydroxymethylation in the advanced-age group was associated with loss of 5-methylcytosine, which suggests that this epigenetic modification plays a role in changes in genomic DNA methylation during lifetime.

During the course of this work we have developed a protocol optimization technique that is applicable to analyze 5hmC through bisulfite pyrosequencing approached. This method allows site-specific DNA hydroxymethylation analysis, and will help to elucidate the functional role of 5hmC in the different biological process, such as cell differentiation, development, aging and disease in future projects.

Resumen

La metilación del ADN genómico en la posición 5 de la citosina (5mC) es el mecanismo epigenético más estudiado y está involucrada en numerosos procesos celulares, como la organización de la cromatina, la impronta genómica, inactivación del cromosoma X y la regulación de la expresión génica, entre otros. Las alteraciones en los patrones de metilación del ADN están relacionadas con el desarrollo de numerosas enfermedades, incluido el cáncer. Además, varios estudios han propuesto que también pueden jugar un papel importante en el envejecimiento y en la predisposición de enfermedades relacionadas con la edad. Por otra parte, el reciente descubrimiento de la 5-hidroximetilcitosina (5hmC), y el hecho de que una parte de la metilación del ADN, que asumía que se trataba en su totalidad de 5mC, se trata en realidad de 5hmC, sugiere que esta marca epigenética deba tenerse también en cuenta en futuros estudios de metilación.

El envejecimiento se caracteriza por una pérdida de funciones corporales acompañado por una degeneración general de células y tejidos. En este contexto, el deterioro y la pérdida de respuesta al daño que tienen lugar a lo largo de la vida en células no terminalmente diferenciadas, como las células madre adultas, jugarían un papel crucial en el proceso de declive celular y tisular durante el envejecimiento.

Esta tesis doctoral tiene como propósito describir los cambios de metilación e hidroximetilación del ADN que tienen lugar a lo largo de la vida de células madre mesenquimales, su relación entre sí y su asociación con las diferentes marcas post-traduccionales de histonas. Para ello, en primer lugar estudiamos los cambios de metilación del ADN en 34 muestras obtenidas de individuos de edades comprendidas entre 2 y 91 años mediante la plataforma *Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit 450 (Illumina Inc)*. Mediante esta tecnología de *microarray*, identificamos 18735 sitios CpG hipermetilados y 45407 hipometilados con la edad. Estos cambios de metilación son, en su mayoría, dependientes del tipo celular ya que sólo una pequeña parte de los cambios es común a otros tipos celulares.

Mientras que la ganancia de metilación durante el envejecimiento está asociada a las marcas represivas de histonas H3K27me3 y H3K9me3, la hipometilación del ADN está relacionada con la marca de activación H3K4me1 en MSCs. Ambas asociaciones tienen también lugar también en células diferenciadas, lo que sugiere que estas marcas de histonas están asociadas a los cambios de metilación durante el

envejecimiento independientemente del tipo celular. Además, el hecho de que la H3k4me1 haya sido recientemente relacionada en estudios previos con *enhancers*, sugiere que, H3k4me1 e hipometilación del ADN, podrían estar implicadas en los cambios de la regulación de expresión génica que tiene lugar durante el envejecimiento.

Además de los cambios de metilación del ADN durante el transcurso de la vida, en esta tesis se describen los patrones de 5hmC en MSCs y los cambios que tienen lugar en individuos de avanzada edad. Para ello, estudiamos los perfiles de 5hmC en 17 muestras obtenidas de individuos de edades comprendidas entre 2 y 89 años, nuevamente, a través de la plataforma *Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit 450 (Illumina Inc)*. Los análisis permitieron identificar 10685 sitios CpG frecuentemente hidroximetilados en células madre mesenquimales que estaban enriquecidos en regiones de baja densidad de CpGs, intrones y regiones intergénicas, y en *enhancers* asociados a la marca de histonas H3K4me1. Estos resultados están en línea con trabajos anteriores tanto de células madre embrionarias, como de células terminalmente diferenciadas.

Un análisis posterior de los datos permitió identificar 1595 sitios CpG diferencialmente hidroximetilados con la edad. De ellos, 749 se hiperhidroximetilaban y 846 hipohidroximetilaban en individuos de avanzada edad. Al comparar los datos de 5hmC con los cambios de 5mC con la edad, se encontró que el aumento de 5hmC asociado a la edad ocurre frecuentemente en regiones que pierden metilación en personas de avanzada edad, en línea con lo descrito en otros trabajos, lo que sugiere que la 5hmC podría jugar un papel en los cambios de metilación del ADN que tienen lugar durante el envejecimiento.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se ha puesto a punto el desarrollo de una técnica que permite el análisis de la 5hmC mediante la pirosecuenciación del ADN en regiones específicas, la cual permitirá, en estudios futuros, el análisis de los patrones de 5hmC de una forma región-específica, lo que ayudará a esclarecer el papel funcional de la 5hmC en el ADN y su implicación en los diferentes procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, el envejecimiento y el desarrollo de diferentes enfermedades, incluido el cáncer.

1. Introducción

1.1 Mecanismos epigenéticos

Todas las células que componen un mismo organismo son genéticamente iguales, sin embargo esta misma información genética es capaz de dar lugar a las diferentes partes, tejidos y células que lo componen. Las diferencias entre los cientos de tipos celulares radican en la conformación de la cromatina y las distintas marcas epigenéticas que posee el genoma de una célula en cada momento, lugar y, también, en respuesta al ambiente que le rodea.

El término epigenética fue acuñado por Conrad Waddington en 1942 como “el área de la biología que estudia las interacciones entre el genotipo y el fenotipo” (Waddington 2012). Esta definición ha ido evolucionando con el paso del tiempo y, actualmente, la epigenética se conoce como el estudio de los cambios en la expresión génica que tienen lugar sin cambios en la secuencia del ADN (Berger, Kouzarides et al. 2009). Estos mecanismos epigenéticos son estables pero, a la vez, son dinámicos y capaces de modificar su conformación para cambiar la expresión de los genes en respuesta a los distintos factores celulares y ambientales (Reik 2007). Juegan un papel importante en diferentes procesos biológicos como el ciclo celular, desarrollo embrionario, diferenciación celular y en la adaptación al ambiente y las variaciones biológicas (Brooks, Le Dantec et al. 2010). Alteraciones en estos mecanismos epigenéticos han sido relacionadas con diferentes enfermedades, entre las que se incluye el cáncer, y también con el envejecimiento (Esteller 2007, Fraga 2009) (Figura



Figura 1. Funciones principales del epigenoma (verde) y principales procesos con los que han sido relacionados alteraciones en este (rojo).

1).

1.1.1 Conformación de la cromatina

La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma (Oudet, Gross-Bellard et al. 1975). Este está formado por un octámero de histonas, compuesto por un heterotetrámero central de histonas H3 y H4, flanqueado por dos heterodímeros de histonas H2A y H2B (Kornberg and Lorch 1999) y rodeado por 147 pares de bases de ADN. Los nucleosomas se encuentran unidos por la histona H1 y separados, aproximadamente, por 50 pares de bases de ADN, lo que se conoce como ADN espaciador. Esto constituye el primer nivel de empaquetamiento de la cromatina, también llamado “collar de perlas” (Figura 2). Sucesivamente, la cromatina se va empaquetando en diferentes niveles hasta formar los cromosomas.

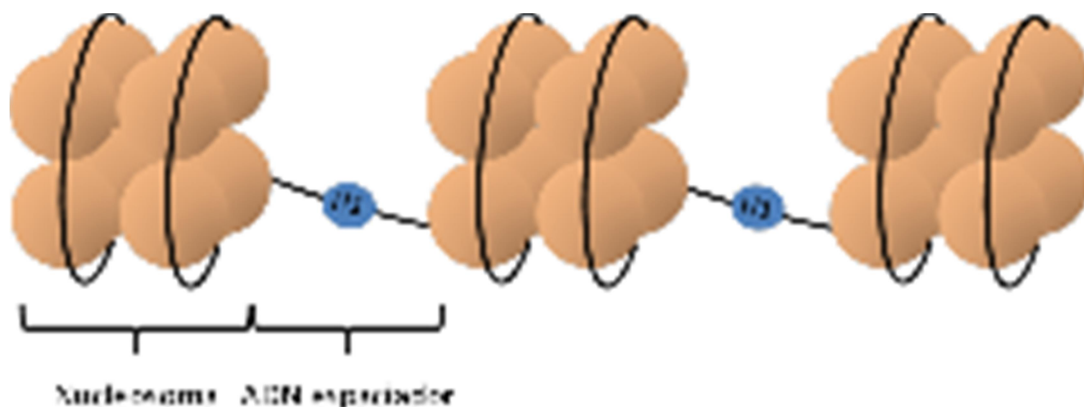


Figura 2. Estructura en “collar de perlas” de la cromatina. Cada nucleosoma (formado por las histonas H2a, H2b, H3 y H4) está rodeado de 147pb de ADN y separado por 50pb de ADN espaciador y la histona H1

En el genoma existen dos grados de compactación de la cromatina diferentes: eucromatina y heterocromatina. La eucromatina se corresponde con un estado poco condensado y se conoce como el estado “activo”, mientras que la heterocromatina concierne un estado más condensado o “reprimido”. La eucromatina representa la proporción más grande del genoma en la cual el ADN tiene flexibilidad para expresarse, replicarse y repararse. Por otro lado, la heterocromatina es una estructura crucial en la protección del final y el centro de los cromosomas y la separación de estos durante la mitosis (Kouzarides 2007).

1.1.2 Metilación del ADN

La metilación del ADN en el carbono 5 prima de la citosina (5mC) es uno de los primeros mecanismos epigenéticos descritos y uno de los más estudiados. Desempeña un papel importante en numerosos procesos biológicos como la organización de la cromatina, la impronta genómica, inactivación del cromosoma X y la regulación de la expresión génica, entre otros (Feinberg, Oshimura et al. 2002, Fraga and Esteller 2007).

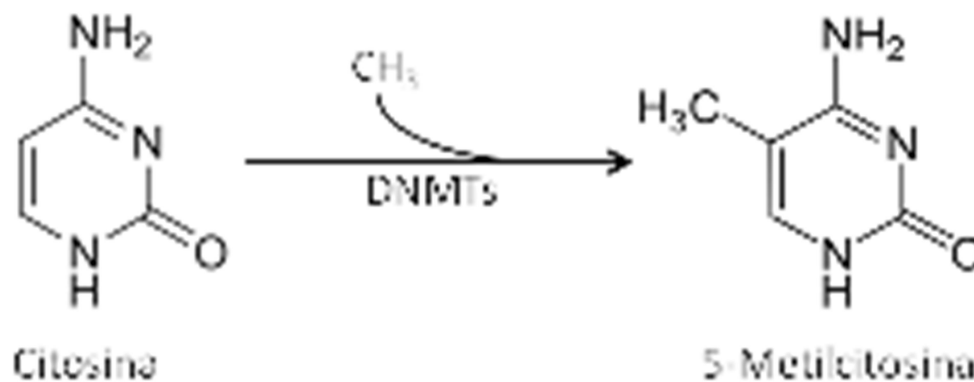


Figura 3. Reacción de metilación. Un grupo metilo se añade al carbono 5' del anillo pirimidínico de una citosina, formándose 5-metilcitosina.

Esta modificación consiste en una unión de un grupo metilo ($-\text{CH}_3$) al anillo pirimidínico de una citosina que precede, normalmente, a una guanina, lo que se conoce como un dinucleótido CpG (CpGs) (Herman and Baylin 2003) (Figura 3). En células somáticas, aproximadamente el 1% de los nucleótidos son citosinas metiladas (Ehrlich, Gama-Sosa et al. 1982). Estos sitios CpG no están distribuidos de forma aleatoria dentro del genoma, sino que una parte se localizan en regiones de ricas en estas secuencias CpG, que se denominan "islas CpG" (Bird 1986, Gardiner-Garden and Frommer 1987). Aproximadamente el 60% de los promotores de los genes están asociados a islas CpG. En general, la metilación en islas CpG localizadas en regiones promotoras está relacionada con el silenciamiento génico. En células sanas la mayoría de estos sitios CpG de regiones promotoras se encuentran no metilados (Bernstein, Meissner et al. 2007), exceptuando en genes relacionados con la impronta genómica (Swain, Stewart et al. 1987), con la inactivación del cromosoma X (Mohandas, Sparkes et al. 1981), o con la represión tisular (Shen, Kondo et al. 2007). Sin embargo, durante

diversos procesos como el desarrollo embrionario, se produce una metilación específica de tejido en islas CpG asociadas a regiones promotoras de estos tejidos (Bird 2002, Strichman-Almashanu, Lee et al. 2002).

Por el contrario, los sitios CpG que se encuentran en regiones intergénicas, repetitivas, transposones y en el cuerpo de los genes se encuentran normalmente metilados en células somáticas, participan en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica y pueden jugar un papel importante en la regulación de la expresión génica (Bernstein, Meissner et al. 2007) (Figura 4).

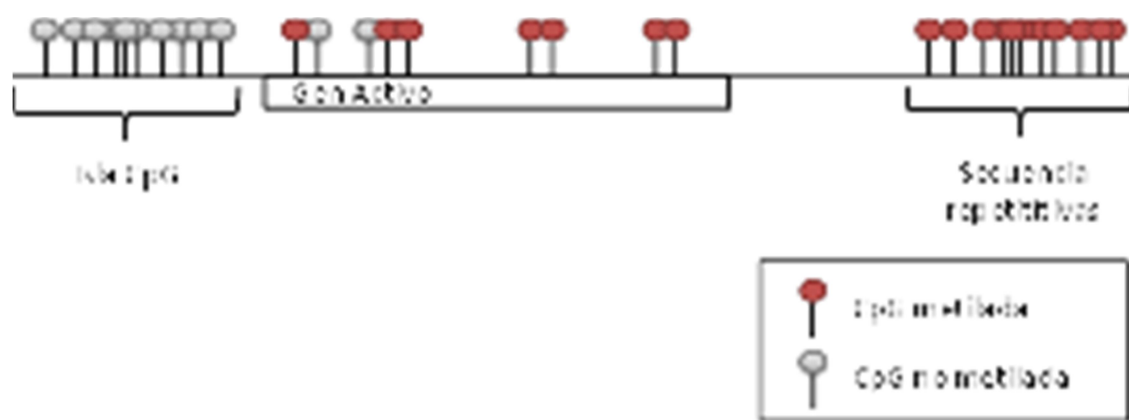


Figura 4. Patrones de metilación en una célula sana.

Alrededor de las islas CpG, se encuentran regiones de aproximadamente 2kb que se denominan *CpG shore island* (orilla de islas CpG). A su vez, alrededor de estas últimas se encuentran regiones de la misma longitud denominadas *CpG shelf island* (saliente de islas CpG) (Figura 5). Se ha visto que la metilación en estas regiones es más dinámica y que parece estar también relacionada con el silenciamiento génico en la diferenciación celular y en cáncer (Doi, Park et al. 2009, Irizarry, Ladd-Acosta et al. 2009, Rao, Evans et al. 2013).

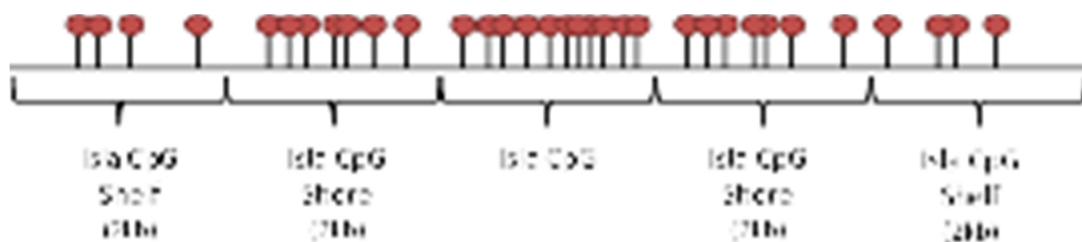


Figura 5. Regiones flanqueantes de islas CpG.

Aunque la metilación del ADN tenga lugar principalmente en sitios CpG, estudios recientes apuntan a que también puede darse en sitios no-CpG (CpA, CpT y CpC), pudiendo tener un papel clave en la regulación de la expresión génica (Pinney 2014). En humanos, cerca de la cuarta parte de la metilación de las células madre embrionarias tiene lugar en sitios no-CpG y esta desaparece durante la diferenciación celular (Lister, Pelizzola et al. 2009).

El mantenimiento de los patrones de metilación durante la mitosis es esencial para el correcto funcionamiento de las células del organismo. Este proceso de metilación es llevado a cabo por las enzimas metiltransferasas del ADN (DNMTs) DNMT1, DNMT3a y DNMT3b (Chen and Riggs 2011). Estas catalizan la transferencia de un grupo metilo de S-adenosil-metionina (SAM), el donador universal de grupos metilo, a una citosina. DNMT1 es la metiltransferasa de mantenimiento responsable de copiar los patrones de metilación de ADN de la hebra hemimetilada a la hebra de nueva síntesis durante la división celular. Por otro lado, las DNMT3a y b son las metiltransferasas *de novo* y son fundamentales para el desarrollo embrionario de los mamíferos y para el establecimiento de la metilación *de novo*, que tiene lugar tras la implantación del embrión (Okano, Bell et al. 1999, Morgan, Santos et al. 2005, Cheng and Blumenthal 2008).

1.1.3 Hidroximetilación del ADN

Actualmente, la 5-hidroximetilcitosina (5hmC) es considerada como la “sexta” base del genoma. Aunque en los años 70 fue descrita por primera vez en el ADN de mamíferos (Penn, Suwalski et al. 1972), no fue hasta 40 años después, en el año 2009, cuando se le dio gran importancia, al descubrirse, de manera paralela, la existencia de altos niveles de esta marca en células de Purkinje y de la capa granulosa (Kriaucionis and Heintz 2009) y que las enzimas *Ten Eleven Translocation* (TET) eran las encargadas en la formación de la 5hmC a partir de la oxidación de 5mC (Tahiliani, Koh et al. 2009).

Uno de los mayores inconvenientes que ha tenido el estudio de la 5hmC tras su descubrimiento ha sido la carencia de métodos robustos para su análisis. Por ejemplo, una de las técnicas más utilizadas para el análisis de la metilación, es la modificación con bisulfito, la cual no es capaz de distinguir entre la 5mC y la 5hmC, ya que esta

última también está protegida frente a la conversión por bisulfito (Jin, Kadam et al. 2010), y ambas se consideran citosinas resistentes a la modificación por bisulfito. Por tanto, tras su descubrimiento, ha sido necesario el desarrollo de nuevas técnicas que permitan la distinción entre ambas bases.

Desde su reciente “redescubrimiento”, se han publicado numerosos trabajos acerca del posible papel funcional de esta marca epigenética y los mecanismos implicados en su regulación. La mayoría de los estudios realizados parecen atribuir un papel dual a la 5hmC: por un lado, esta estaría implicada en procesos de demetilación y, por otro, tendría un papel en la regulación de la expresión génica.

La existencia o no de mecanismos de demetilación del ADN ha sido un tema muy controvertido en las últimas décadas. El mecanismo de demetilación del ADN más ampliamente aceptado en la literatura es la pérdida pasiva de esta durante la división celular. Sin embargo, este no explica, por ejemplo, la pérdida de metilación que tiene lugar en el pronúcleo masculino tras la fertilización previa a la división celular (Mayer, Niveleau et al. 2000). Actualmente, tras el descubrimiento de la 5hmC, se ha postulado acerca la existencia de procesos de demetilación, tanto activos como pasivos, en los que la 5hmC podría jugar un papel importante.

La familia de proteínas TET está formada por TET1, TET2 y TET3. Pertenecen a la familia de las α -cetoglutaratas y las dioxigenasas hierro-dependientes, que requieren α -cetoglutarato (α KG) como co-substrato y hierro y ascorbato como cofactores. La familia de las proteínas isocitrato deshidrogenasas (IDH) son las encargadas de la síntesis del α KG. TET1 y TET3 tienen un dominio aminoterminal CXXC, igual que el que contienen otras proteínas, como la metiltransferasa DNMT1, donde funciona como un dominio de unión a citosinas no metiladas (Iyer, Tahiliani et al. 2009). Aunque su función en las TET es desconocida, se cree que es capaz de unirse tanto a la citosina no metilada, como a la metilada y a la hidroximetilada (Zhang, Zhang et al. 2010, Xu, Wu et al. 2011).

Todas las proteínas TET son capaces, además de oxidar la 5mC a 5hmC, de llevar a cabo oxidaciones sucesivas y convertir la 5hmC en 5-formilcitosina (5fC) y, posteriormente, en 5-carbonilcitosina (5caC) (Ito, Shen et al. 2011) (Figura 6). Ambas, 5fC y 5caC, son sustrato de la Timina-ADN-glicosilasa (TDG), la cual da lugar a la activación del sistema de reparación por escisión de bases (BER) que convierte 5fC y

5caC en una citosina no metilada (He, Li et al. 2011, Maiti and Drohat 2011). Estudios previos han visto una relación entre la expresión de TET y los niveles de 5hmC. La sobreexpresión de TET1 *in vitro* da lugar a un descenso en los niveles de 5mC y a un ligero aumento de 5hmC (Tahiliani, Koh et al. 2009). Durante la diferenciación de células madre embrionarias (ESCs, *embryonic stem cells*), tiene lugar una represión de TET1 acompañada por una disminución de los niveles de 5hmC (Tahiliani, Koh et al. 2009). Además, se ha descrito que la expresión más alta de TET3 se encuentra en los oocitos y en los cigotos y que los niveles de 5hmC aumentan en el pronúcleo masculino tras la fertilización, lo que podría indicar que podría tener un papel importante en la demetilación del ADN que tiene lugar en esa etapa (Gu, Guo et al. 2011, Iqbal, Jin et al. 2011, Wossidlo, Nakamura et al. 2011). Aparte de este mecanismo activo de demetilación, se ha visto que la 5hmC también podría participar en el proceso de manera pasiva. El contenido de 5hmC se reduce gradualmente durante la replicación en embriones de ratón (Inoue and Zhang 2011), lo cual podría ser debido a que la afinidad de DNMT1 es menor cuando la hebra está hemi-hidroximetilada que cuando está hemi-metilada (Hashimoto, Liu et al. 2012). De hecho, existen estudios en células diferenciadas que relacionan la ganancia de 5hmC con el tiempo asociado a la pérdida de 5mC (Szulwach, Li et al. 2011, Wen, Li et al. 2014).

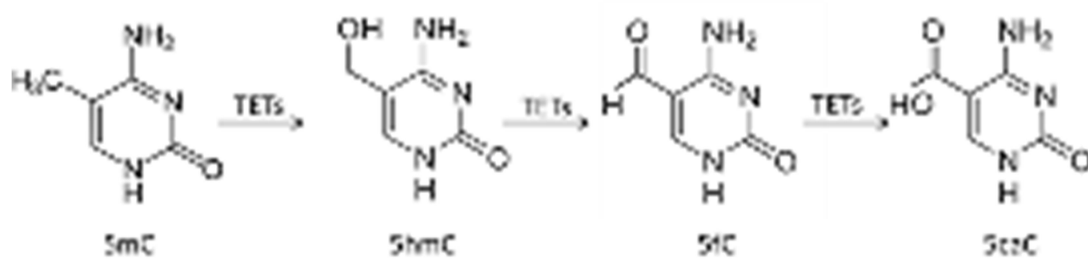


Figura 6. Oxidaciones sucesivas de la metilcitosina llevadas a cabo por las proteínas TET.

El hecho de que los niveles globales de 5hmC en los diferentes tejidos sean tan heterogéneos (Globisch, Munzel et al. 2010, Nestor, Ottaviano et al. 2012), al contrario que los niveles globales de 5mC los cuales son más similares, no parece indicar que la función de esta modificación del ADN sea únicamente la de intermediaria en la pérdida de metilación. Existen numerosos trabajos que relacionan la 5hmC con la activación

transcripción mediada por *enhancers* tanto en células embrionarias, como diferenciadas (Stroud, Feng et al. 2011, Yu, Hon et al. 2012, Tsagaratou, Aijo et al. 2014, Wen, Li et al. 2014, Feng, Shao et al. 2015). Los *enhancers* son regiones cortas del ADN alejadas de la zona de inicio de transcripción de genes cuya función es la activación génica. Se ha visto que estas regiones están asociadas a marcas activas de histonas (Creyghton, Cheng et al. 2010) y el hecho de que se hayan visto asociados a la 5hmC podría indicar que esta modificación juega un papel funcional en la activación de la transcripción.

1.1.4 Modificaciones post-traduccionales de las histonas

Las histonas, además de formar la estructura del nucleosoma, poseen una cola amino-terminal susceptible de sufrir modificaciones post-traduccionales como acetilación, metilación, fosforilación o ubiquitilación. Se han descrito más de 60 modificaciones diferentes en las colas de histonas, aunque se cree que este número es subestimado. Además, modificaciones como la metilación, se pueden dar en diferente número y forma; las lisinas pueden estar mono- di- y trimetiladas, mientras que las argininas pueden estar mono- o dimetiladas de forma simétrica o asimétrica (Kouzarides 2007).

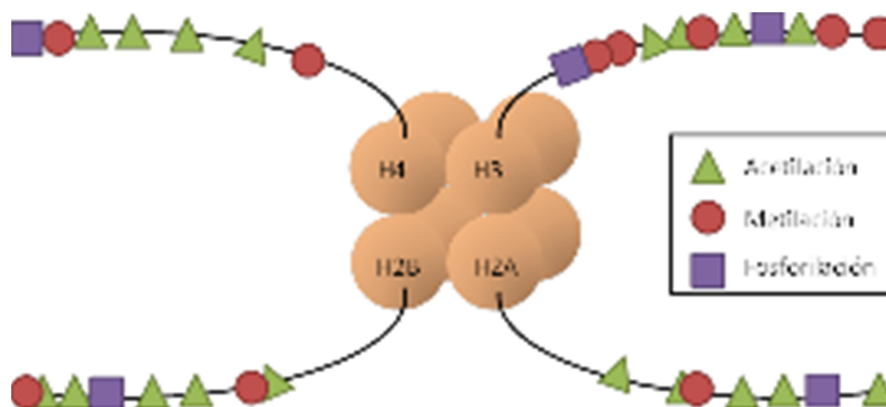


Figura 7. Representación esquemática de un nucleosoma con las modificaciones post-traduccionales de las colas de las diferentes histonas.

Estas modificaciones no se distribuyen de manera uniforme dentro del genoma y, además, son dinámicas y reversibles, por lo que necesitan estar estrictamente reguladas, tanto espacial como temporalmente. La combinación de las diferentes modificaciones da lugar a lo que se conoce como el código de histonas (Jenuwein and Allis 2001) (Figura 7). Estas modificaciones participan en la compactación de la cromatina permitiendo, o no, el acceso a la maquinaria de transcripción, de reparación del ADN, de replicación del ADN, y, además, juegan un papel en la condensación cromosómica (Turner 2002).

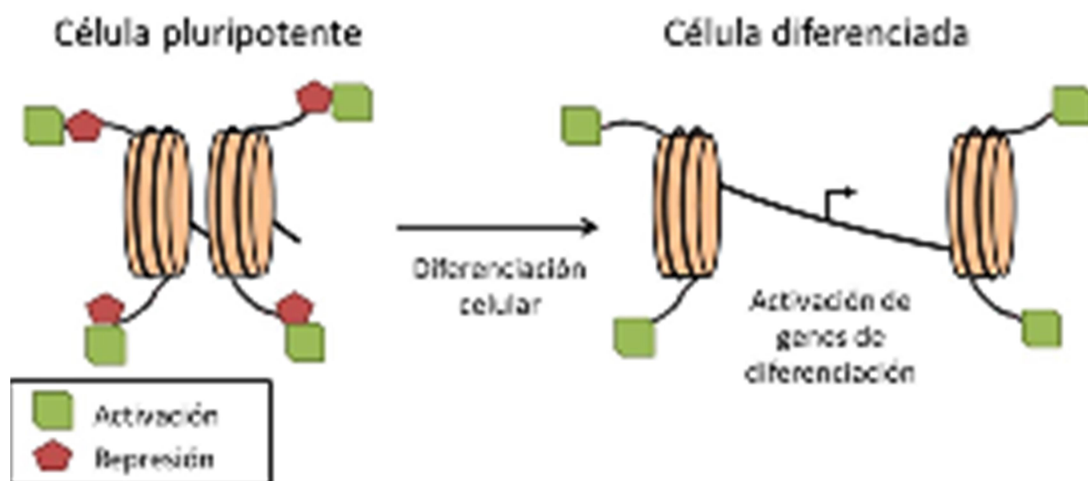


Figura 8. Representación esquemática de un dominio bivalente de una región determinada. En células pluripotentes estas regiones están asociadas a marcas de activación y represión. Durante la diferenciación celular, las marcas de represión desaparecen, activándose genes implicados en el proceso de diferenciación celular.

Dependiendo del tipo de modificación post-traducciona, el efecto en la conformación de la cromatina y, por tanto, en la regulación de la expresión génica, es diferente. En líneas generales, la adición de grupos acetilo a lisinas se corresponde con una conformación más abierta de la cromatina y, por tanto, con un aumento de la transcripción, debido a que la acetilación anula la carga positiva de la lisina y disminuye su interacción con las cargas negativas de los grupos fosfato del esqueleto del ADN. En el caso de la metilación, su efecto varía dependiendo del residuo en el que tenga lugar. Por ejemplo, la metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3k4me1/2/3) está relacionada con la activación transcripcional, mientras que la trimetilación, tanto de la

lisina 9 como la lisina 27 de la histona H3 (H3k9me3 y H3k27me3, respectivamente), se consideran marcas represivas de histonas que dan lugar a una mayor condensación de la cromatina (Meshorer, Yellajoshula et al. 2006). Existen regiones del genoma que contienen ambas modificaciones, de activación y de represión, las cuales se conocen como dominios bivalentes. Estos dominios se encuentran sobretodo en células madre embrionarias y adultas y se cree que juegan un papel importante en la pluripotencia, al mantener genes clave en la diferenciación silenciados, pero preparados para una activación en el momento de inicio del proceso de diferenciación celular (Bernstein, Mikkelsen et al. 2006) (Figura 8).

La metilación del ADN y las modificaciones post-traduccionales de las histonas no son mecanismos aislados, sino que funcionan de manera conjunta dando lugar bien a una cromatina más condensada, o bien, más abierta (Rodriguez-Paredes and Esteller 2011). En humanos la heterocromatina está asociada con bajos niveles de acetilación y altos niveles de metilación de ciertas marcas de histonas (H3K9, H3K27 y H4K20) e hipermetilación del ADN. Por el contrario, la eucromatina, transcripcionalmente activa, está asociada a altos niveles de acetilación y de metilación de algunos residuos (H3K4, H3K36 y H3K79), junto con bajos niveles de metilación del ADN.

Estas modificaciones químicas son llevadas a cabo por diferentes enzimas. Las histona acetil transferasas (HATs) y las histona desacetilasas (HDACs) son las encargadas de acetilar y desacetilar histonas, respectivamente. Las HATs tienen una estructura y sustratos diversos y normalmente están formadas por un gran número de subunidades (Lee and Workman 2007). Las HDACs, por su parte, se dividen en 4 clases: HDACs I, II, IV y III o Sirtuinas (Yang and Seto 2007). Por otro lado, la metilación de las histonas es llevada a cabo por histona metiltransferasas (HMTs), que utilizan, al igual que las DNMTs, SAM como donador de grupos metilo.

1.1.5 Complejos Polycomb y Tritórax

Las proteínas del grupo polycomb y tritórax son un conjunto de proteínas muy conservadas capaces de remodelar la cromatina con la función de silenciar o activar genes, respectivamente. Estas proteínas fueron descubiertas en *Drosophila*

melanogaster como activadores y represores de los genes *Hox* (Schuettengruber, Chourrout et al. 2007).

Las proteínas del grupo polycomb se componen principalmente de dos complejos: PRC1 y PRC2. Estos complejos promueven el reclutamiento de marcas represivas de histonas como la H3k27me3 y la ubiquitinación en la histona H2A (H2Aub1) (Ku, Koche et al. 2008). Por otro lado, el complejo tritórax está formado por un grupo más heterogéneo cuya finalidad es mantener la expresión génica mediante la modificación de histonas, la remodelación de la cromatina y la unión al ADN (Schuettengruber, Chourrout et al. 2007).

Ambos complejos juegan un papel clave en la regulación epigenética de la expresión génica durante el desarrollo embrionario, la diferenciación y proliferación celular, impronta genómica e inactivación del cromosoma X (Delaval and Feil 2004, Guitton and Berger 2005, Heard 2005, Martin, Cao et al. 2006, Muller and Kassis 2006, Schwartz, Kahn et al. 2006).

1.1.6 Proteínas con dominios de unión al ADN metilado

El ADN puede interactuar con proteínas que tienen dominios de unión al ADN metilado (MBD, *methyl binding domain*). Esta familia de proteínas está formada por varios miembros. El primero en descubrirse fue MeCP2 y, posteriormente, por homología se identificaron 6 miembros más (MBD1-6) (Hendrich and Bird 1998, Ballestar and Esteller 2005, Baymaz, Fournier et al. 2014). Todas estas proteínas tienen un dominio de unión a sitios CpG metilados, a excepción de MBD5 y 6 cuyos dominios no parecen unirse a CpGs. Son claves en la determinación del estado transcripcional del genoma. Funcionan como represores de la transcripción génica uniéndose a sitios CpG metilados y reclutando proteínas, haciendo así a la cromatina inaccesible para la maquinaria de transcripción. Generalmente, inducen cambios en la cromatina a través del aumento de marcas represivas de histonas, del reclutamiento de desacetilasas de histonas, de la remodelación de los nucleosomas y de la reorganización de la cromatina (Hendrich and Bird 1998).

Aunque el papel más ampliamente descrito de estas proteínas es la represión de la transcripción, las funciones de este conjunto de enzimas parece ser más

complejo. Se ha visto que MBD3 es capaz de unirse a sitios CpGs no metilados, promotores activos y *enhancers*, al igual que MBD2, pero esta sólo cuando MBD3 está presente. Ambas pueden funcionar como activadoras de la transcripción y participar en la diferenciación durante el desarrollo embrionario (Du, Luu et al. 2015). Por otro lado, algunos estudios relacionan a MBD4 con la demetilación activa (Rai, Huggins et al. 2008, Hashimoto, Zhang et al. 2012), aunque esta asociación no ha sido posible de confirmar (Shimoda, Hirose et al. 2014). Además, tanto MBD3 como MeCP2 son capaces de unirse a la 5hmC (Yildirim, Li et al. 2011, Mellen, Ayata et al. 2012). Aunque la función de esta interacción no está clara, en el caso de MeCP2 parece estar relacionada con la activación transcripcional (Mellen, Ayata et al. 2012).

1.2 Epigenética y enfermedades

Es bien sabido que los cambios irreversibles en la secuencia del ADN como las deleciones cromosómicas y las mutaciones genéticas están implicados en la progresión e iniciación de numerosas enfermedades. Pero además, en los últimos años, el estudio de las alteraciones en los patrones epigenéticos se ha asociado a numerosas patologías, entre las que se incluye el cáncer.

Hoy en día, el cáncer se considera tanto una enfermedad genética como epigenética. Durante el desarrollo del cáncer, se produce una hipometilación global del ADN (Feinberg and Tycko 2004) y una hipermetilación específica de promotores. Este último suceso, adquiere gran relevancia en el desarrollo del cáncer cuando tiene lugar en genes supresores tumorales y, como consecuencia, da lugar al silenciamiento de estos (Baylin 2005). Además de la metilación del ADN, durante el desarrollo del cáncer también se han descrito cambios epigenéticos como, por ejemplo, en las modificaciones post-traduccionales de las histonas, donde se ha descrito un descenso en la acetilación de la histona H4 (Fraga, Ballestar et al. 2005) o un aumento de H3k9me3 (Park, Jin et al. 2008).

En el sistema nervioso los mecanismos epigenéticos son claves para los procesos celulares como la sinapsis, el aprendizaje y la memoria (Graff and Mansuy 2008). Numerosas alteraciones epigenéticas se han visto relacionadas con diferentes

enfermedades neurodegenerativas como los síndromes de Rubinstein-Taybi, de Rett, de cromosoma X frágil, y enfermedades como alzhéimer, Huntington y esquizofrenia.

Uno de los ejemplos más claros de asociación entre epigenética y enfermedad neurodegenerativa es el síndrome de *Rett*, desorden neurológico dominante ligado al cromosoma X. Este síndrome afecta a niñas, principalmente, con una prevalencia de 1 cada 10000-15000 nacimientos, y cuando se da en varones normalmente da lugar a abortos espontáneos durante el desarrollo embrionario. En niñas se caracteriza por un desarrollo normal durante los primeros 6-18 meses de vida, seguido de la aparición de problemas neurológicos severos (Rett 1986). Este síndrome está causado principalmente por mutaciones o duplicaciones del gen *MeCP2* (Van Esch, Bauters et al. 2005, Bird 2008, Urdinguio, Sanchez-Mut et al. 2009), dando como consecuencia una regulación de la activación génica errónea que da lugar a la sintomatología de la enfermedad.

Además de estos dos ejemplos en los que los cambios epigenéticos han sido ampliamente definidos, existen numerosas enfermedades que se han relacionado con alteraciones epigenéticas, cuya susceptibilidad aumenta durante el envejecimiento, que se comentará en una sección posterior.

1.3 Epigenética y envejecimiento

El envejecimiento se caracteriza por un declive progresivo de la integridad fisiológica, tanto macro como microscópicamente, dando lugar a una pérdida de función del tejido y, por tanto, a una menor efectividad en la respuesta a daño y mayor susceptibilidad de contraer enfermedades, como la diabetes tipo 2, alteraciones cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y cáncer.

Es un proceso complejo que no puede ser explicado por un solo mecanismo. Aunque se han identificado algunas variantes genéticas que regulan la longevidad del ser humano (Deelen, Beekman et al. 2011, Nebel, Kleindorp et al. 2011), tan sólo el 20-30% de la esperanza de vida humana puede ser atribuido a la genética (Herskind, McGue et al. 1996). Parte de los mecanismos moleculares implicados en el proceso de envejecimiento están aún por determinar (Oh, Lee et al. 2014).

En las últimas décadas, el estudio del envejecimiento y los mecanismos moleculares implicados en él ha levantado gran interés debido al sustancioso aumento de la esperanza de vida que ha tenido lugar en el último siglo. El conocimiento de estos mecanismos y la búsqueda de la manera de revertirlos y/o ralentizarlos, tiene como fin principal ayudar a mejorar la calidad y alargar la vida de los seres humanos y, secundariamente, el abaratamiento de los altos costes sanitarios que supone el tratamiento de las enfermedades asociadas al envejecimiento. Recientemente, de manera similar a como lo hicieron anteriormente Hanahan y Weinberg con el estudio de los mecanismos moleculares implicados en cáncer (Hanahan and Weinberg 2011), en un trabajo publicado por López-Otín y col. se han descrito 9 mecanismos implicados en el envejecimiento (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013), entre los que se incluyen las modificaciones epigenéticas, como la metilación del ADN, los ARNs no codificantes y las modificaciones post-traduccionales de las histonas. Estos mecanismos podrían tener un papel central en los cambios de expresión génica y la inestabilidad genómica que tiene lugar en el envejecimiento (Mostoslavsky, Chua et al. 2006, Oberdoerffer, Michan et al. 2008).

Aunque parte del epigenoma puede permanecer estable a lo largo del envejecimiento, en algunos casos gran variedad de mecanismos epigenéticos como las modificaciones post-traduccionales de las histonas, la metilación del ADN y los enzimas implicados en ellos, se ven afectados tanto en las células como en los tejidos. El epigenoma de un organismo está en continuo cambio de manera dinámica y en respuesta al ambiente, modificando los perfiles de expresión génica de las células del organismo y, a lo largo de la vida, se van acumulando alteraciones epigenéticas en procesos que dependen de la genética, del ambiente y de factores estocásticos.

Los cambios epigenéticos asociados con el envejecimiento han sido estudiados en múltiples organismos, desde levaduras hasta humanos. Concretamente, uno de los modelos cuyas variaciones epigenéticas durante el envejecimiento han sido mejor estudiadas, es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En esta, se ha visto como la inactivación de la histona desacetilasa Sir2 tiene como consecuencia el acortamiento de los telómeros, mientras que su activación ha sido relacionada con el aumento de tiempo de vida (Longo and Kennedy 2006). Además, se ha descrito que los niveles de la acetilación de la lisina 16 en la histona H4 (H4k16ac) aumentan en regiones

subteloméricas, asociado a la reducción de la expresión de Sir2 durante el envejecimiento de levaduras, y también regulado por la acetiltransferasa Sas2. Ambas, Sir2 y Sas2 podrían modular de forma antagónica la esperanza de vida a través de la regulación de los niveles de H4k16ac en estas regiones (Dang, Steffen et al. 2009). En otros organismos invertebrados como gusanos y moscas, se ha visto un efecto antienvjecimiento en el aumento de los niveles de proteínas homólogas a Sir2, pero no de forma tan clara como en levaduras (Tissenbaum and Guarente 2001, Rogina and Helfand 2004).

En humanos, uno de los mejores diseños experimentales para el estudio de los cambios epigenéticos genético-independientes a lo largo de la vida, ha sido el análisis de los gemelos monocigóticos. Estos poseen la misma información genética, sin embargo su epigenoma diverge según van envejeciendo (Fraga, Ballestar et al. 2005). Con el estudio de gemelos se ha podido demostrar que la genética influye en parte en la epigenética, ya que los gemelos monocigóticos tienen un epigenoma más parecido entre sí que los dicigóticos (Kaminsky, Tang et al. 2009). Otro modelo para estudiar los mecanismos implicados en el envejecimiento son los síndromes progeroides (envejecimiento prematuro) como el síndrome de *Hutchinson-Gilford* y el de *Werner*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos no representan un envejecimiento natural. A pesar de ello, se ha descrito la existencia de aberraciones epigenéticas ligadas a estas enfermedades (Agrelo, Cheng et al. 2006, Osorio, Varela et al. 2010).

1.3.1 Cambios de metilación del ADN a lo largo de la vida

Está ampliamente demostrado que a lo largo de la vida y, durante el envejecimiento, la metilación del ADN cambia (Jaenisch and Bird 2003), aunque de forma más acusada durante las primeras etapas de la vida (Alisch, Barwick et al. 2012). De hecho, el estado de metilación del ADN es capaz de revelar de forma bastante aproximada la edad de un individuo (Hannum, Guinney et al. 2013), incluso mirando el estado de metilación en células sanguíneas de tan sólo 3 sitios CpG (Weidner, Lin et al. 2014).

Algunos de los cambios de metilación del ADN a lo largo de la vida juegan un papel importante durante el envejecimiento y son comunes entre individuos, aunque

los mecanismos implicados en estos procesos son poco conocidos. Sin embargo, otros ocurren de manera estocástica, lo que se conoce como deriva epigenética, la cual es diferente en cada individuo, y es objeto de estudio debido a su posible implicación en enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Bjornsson, Cui et al. 2004, Heyn, Moran et al. 2013, Timp and Feinberg 2013), incluso, recientemente, se ha propuesto que esta acumulación de cambios podría jugar un papel clave en el envejecimiento al funcionar como un reloj mitótico (Issa 2014). Esta deriva no es direccional, ya que ocurren cambios en ambos sentidos (hipo e hipermetilación de ADN), no se distribuye de manera uniforme en el genoma y es bastante variable entre individuos de la misma edad y entre los diferentes tejidos (Issa 2014). Aunque las consecuencias de la deriva epigenética aún son especulativas, esto podría indicar que la acumulación de errores epigenéticos durante el envejecimiento podría ser, por un lado, un factor de riesgo de contraer diversas enfermedades relacionadas con este, y por otro, participar en el declive y la pérdida de función celular.

La primera asociación entre epigenética y envejecimiento fue descrita en los años 60 por B. F. Vaniushin y col. (Berdyshev, Korotaev et al. 1967) donde se describió una pérdida global progresiva de metilación del ADN en salmón. Esta reducción fue confirmada posteriormente en otras especies, incluido en humanos (Wilson, Smith et al. 1987). Esta pérdida de metilación podría deberse a una pérdida de eficacia de la DNMT1 durante la división celular o a errores de unión de la enzima a sus cofactores (Casillas, Lopatina et al. 2003), aunque podrían existir otros mecanismos, como el de las enzimas TET y la 5hmC. Esta hipometilación global del ADN ha sido descrita en diversas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, enfermedades autoinmunes y arterioesclerosis, entre otras (Agrawal, Tay et al. 2010, Wierda, Geutskens et al. 2010). Además, la pérdida de metilación del ADN se ha relacionado *in vitro* con la senescencia celular (Wilson and Jones 1983). Además de una hipometilación global, también ha sido descrita una hipermetilación del ADN específica de promotores génicos durante el envejecimiento. Algunos ejemplos de genes que se hipermetilan son el receptor de estrógenos (ER), factor de crecimiento de insulina tipo 2 (*IGF2*), *MYOD1*, genes supresores tumorales como *MLH1*, *p14ARF*, lisil oxidasa (*LOX*), *p16INK4α*, *RUNX3*, *TIG1* (Issa 2003, Flanagan, Pependikyte et al. 2006). Esta hipermetilación específica podría tener lugar bien de manera uniforme en todas las

células, o suceder de manera más acusada en una pequeña porción de células, mientras que en el resto permanece invariable (Figura 9).

Ambos mecanismos, hipometilación global e hipermetilación específica del ADN, han sido descritos en tejidos como células sanguíneas (Heyn, Li et al. 2012, Johansson, Enroth et al. 2013), o córtex prefrontal (Numata, Ye et al. 2012), a excepción del músculo esquelético, donde se ha descrito la existencia de una hipermetilación global del ADN durante el envejecimiento (Zykovich, Hubbard et al. 2014).

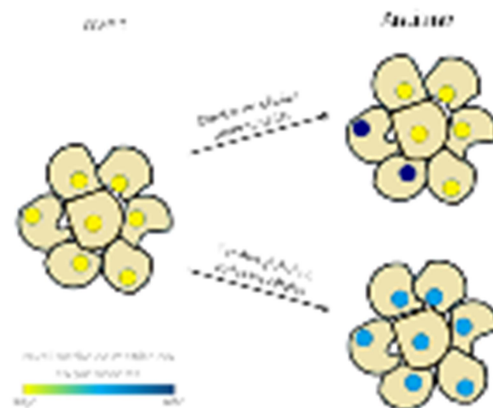


Figura 9. Hipermetilación específica de promotores. Durante el envejecimiento, la hipermetilación del ADN en promotores génicos puede tener lugar de manera homogénea en todas las células o, bien, suceder de manera acusada en una pequeña porción de ellas.

Estos cambios globales y gen específicos de metilación del ADN durante el envejecimiento, van acompañados de cambios post-traduccionales de histonas. Tanto los niveles de acetilación de la H3k9 como de trimetilación de la H3k27 disminuyen de manera global a lo largo de la vida en células normales (Bracken, Kleine-Kohlbrecher et al. 2007, Kawakami, Nakamura et al. 2009). Además, se ha visto que genes que se hipermetilan en células sanguíneas durante el envejecimiento, están enriquecidos en dominios bivalentes de histonas en células madre embrionarias y en marcas represivas de histonas en células diferenciadas (Rakyan, Down et al. 2010, Fernandez, Assenov et al. 2012, Heyn, Li et al. 2012).

1.3.2 Factores ambientales a lo largo de la vida

Parte de los cambios epigenéticos que sufre un organismo a lo largo de su vida podrían ser consecuencia de la respuesta a factores ambientales. Existen dos escenarios diferentes a tener en cuenta a la hora de estudiar el impacto que puede tener el ambiente en el epigenoma: el desarrollo embrionario y la vida adulta. En el primer caso, la influencia del ambiente es más crucial, debido al alto número de divisiones celulares y los cambios críticos epigenéticos que tienen lugar durante ese periodo (Aguilera, Fernandez et al. 2010). Además, un efecto sobre el epigenoma en una célula indiferenciada, las cuales se encuentran en mayor proporción durante el desarrollo embrionario, será heredado por las subsecuentes poblaciones celulares.

Las influencias ambientales a las que está sometido el embrión están determinadas por dos factores principales: el estilo de vida de la madre y las circunstancias fenotípicas y anatómicas de esta, es decir: el tamaño del útero, placenta, etc. (Huidobro, Fernandez et al. 2013).

En cuanto a la influencia ambiental en el epigenoma a lo largo de la vida de un individuo, a pesar de la amplia literatura existente sobre el tema, los mecanismos moleculares implicados son aún poco conocidos (Aguilera, Fernandez et al. 2010). En este caso, dependiendo del tejido que se vea afectado las consecuencias pueden ser mayores o menores. Cuando se produce una alteración en una célula madre adulta, el efecto será mayor que si tiene lugar en una célula terminalmente diferenciada (Huidobro, Fernandez et al. 2013).

Los diferentes factores ambientales como la dieta, el entorno de vida, o los factores farmacológicos, pueden alterar el epigenoma de diferentes maneras durante la vida adulta y, como resultado, tener un efecto en la salud y dar lugar al desarrollo de diferentes enfermedades.

Existen numerosos componentes de la dieta y hábitos alimentarios que se han visto relacionados con alteraciones en el epigenoma. Uno de los ejemplos mejor estudiados es el del folato y otros donadores de grupos metilo, cuyos niveles se ha visto que pueden afectar al epigenoma tanto de manera global como específica (Keyes, Jang et al. 2007, Heijmans, Tobi et al. 2008, Kotsopoulos, Sohn et al. 2008, Feil and Fraga 2011).

La restricción calórica, que se conoce como el régimen basado en la reducción diaria en el número de calorías, ha sido relacionada en adultos con un aumento de la longevidad de diversos organismos eucariotas (Ingram, Weindruch et al. 1987, Austad 1989, Natelson, Ottenweller et al. 1992, Chapman and Partridge 1996, Pugh, Oberley et al. 1999, Lin, Kaeberlein et al. 2002, Colman, Anderson et al. 2009). Los mecanismos moleculares implicados en la regulación de este aumento en la esperanza de vida son muy diversos y los mecanismos epigenéticos parecen jugar un papel importante en ellos (Fang, Chen et al. 2007, Fernandez and Fraga 2011). La restricción calórica podría atenuar los cambios epigenéticos que se producen con el envejecimiento (Li, Liu et al. 2010, Chouliaras, van den Hove et al. 2011, Munoz-Najar and Sedivy 2011).

Los compuestos bioactivos son componentes de los alimentos que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos que presentan efectos beneficiosos para la salud; se ha visto que pueden alterar el desarrollo a través de la generación de cambios epigenéticos que pueden mejorar la salud y ralentizar el envejecimiento. Por ejemplo, se ha visto que el té verde es capaz de afectar a las DNMTs en diferentes tipos de cáncer (Henning, Wang et al. 2013). Otros compuestos como el sulforafano del brócoli o el dialil disulfido del ajo han sido identificados como inhibidores de desacetilasas y podrían tener un papel en la prevención del cáncer (Dashwood and Ho 2007).

Recientemente, se ha descrito que el ácido ascórbico o Vitamina C es capaz de inducir la formación de 5hmC (Blaschke, Ebata et al. 2013, Minor, Court et al. 2013). Se cree que actúa como cofactor de las proteínas TET, aumentando la actividad catalítica de las enzimas endógenas sin aumentar sus niveles de expresión (Dickson, Gustafson et al. 2013).

Por el contrario, malos hábitos de la dieta, como el abuso en la ingestión de grasas, que han sido relacionados con el aumento de metilación del ADN de genes supresores tumorales (Brait, Ford et al. 2009).

Las modificaciones epigenéticas se ven, además, afectadas por agentes contaminantes a lo largo de la vida (Baccarelli and Bollati 2009). La exposición a la polución ha sido asociada con cambios en la metilación del ADN de genes relacionados con la inflamación y el sistema inmune, y con la metilación del ADN en regiones repetitivas, pudiendo dar lugar a un mal funcionamiento pulmonar, el cual se ha

relacionado con el desarrollo de cáncer de pulmón (Hou, Zhang et al. 2014, Lepeule, Bind et al. 2014). Diversos estudios relacionan la exposición a asbestos con un aumento en la metilación del ADN en promotores de genes supresores tumorales, lo cual podría estar relacionado con el desarrollo de mesotelioma pleural maligno (Tsou, Shen et al. 2005, Christensen, Godleski et al. 2008, Cheng, Kirschner et al. 2013).

Otra sustancia ampliamente descrita que puede afectar nuestro epigenoma a lo largo de nuestra vida es el bisfenol A (BPA). El BPA es un producto químico que se utiliza desde hace muchos años como componente para la fabricación de policarbonato y resinas epoxi-fenólicas. Se utiliza tanto para hacer envases de alimentos, como para otros muchos objetos no relacionados con la alimentación con los que día a día estamos en contacto, como pueden ser CDs o DVDs, juguetes, cosméticos, etc. La exposición a BPA se ha relacionado con hipometilación global del ADN en ratones *agouti* (Dolinoy, Huang et al. 2007, Anderson, Nahar et al. 2012), en el cromosoma X en niñas (Kim, Rozek et al. 2013), en genes de la impronta genómica (Susiarjo, Sasson et al. 2013) y con hipermetilación del ADN específica de promotores (Weng, Hsu et al. 2010, Tang, Morey et al. 2012). Además de cambios en la metilación, también se han descrito un incremento de la actividad de la histona metiltransferasa EZH2 y de los niveles de metilación de la histona H3 (Doherty, Bromer et al. 2010, Weng, Hsu et al. 2010).

Algunos tratamientos farmacológicos, asimismo, producen cambios epigenéticos globales. Por ejemplo, el valproato de sodio, es un medicamento usado para tratar la epilepsia, el desorden bipolar, la depresión, la migraña, la esquizofrenia, como coadyuvante en el tratamiento del cáncer y el VIH, etc. (Villar-Garea and Esteller 2004, Huber, Doyon et al. 2011). Se trata de un inhibidor de desacetilasas de histonas y, por tanto, produce cambios globales en la acetilación de histonas.

La decitabina y la azacitidina son dos medicamentos quimioterápicos usados para tratar los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. Ambos son agentes demetilantes; se unen a la citosina durante la división celular, bloqueando la acción de las DNMTs (Baylin 2005). El tratamiento con estos agentes hipometilantes da lugar a la reactivación de genes supresores tumorales silenciados mediante hipermetilación de promotores durante el proceso de formación del cáncer. Sin embargo, los cambios que produce, al igual que el valproato, son globales. Estudios

recientes apuntan a que este medicamento además de dar lugar a una hipometilación global del ADN, es capaz de aumentar los niveles de 5hmC; si bien los mecanismos moleculares a través de los cuales es capaz de ejercer esta función son aún desconocidos (Chowdhury, McGovern et al. 2015, Sajadian, Ehnert et al. 2015).

El dietilestilbestrol (DES) es una forma sintética de la hormona femenina estrógeno que se recetaba a las mujeres embarazadas entre los años 1940 y 1971 para prevenir abortos espontáneos, partos prematuros y otras complicaciones relacionadas con el embarazo. Este compuesto ha sido relacionado con un aumento del riesgo de cáncer de mama y de cuello de útero (Veurink, Koster et al. 2005, Fleming, Huang et al. 2008). Esto podría estar mediado por mecanismos epigenéticos, ya que se ha visto que la exposición de DES en ratones produce un descenso en la expresión de *DNMTs*.

1.3.3 Epigenética de enfermedades asociadas al envejecimiento

Como se ha comentado previamente, durante el envejecimiento aumenta la predisposición de contraer diferentes enfermedades. Esta predisposición puede estar determinada, en parte, por alteraciones epigenéticas que se producen durante el envejecimiento.

1.3.3.1 Alzhéimer

El alzhéimer es una enfermedad neurodegenerativa, asociada a la demencia, que se caracteriza por una pérdida progresiva de memoria y habilidades cognitivas. Aunque se han descrito numerosos factores genéticos que aumentan el riesgo de contraer la enfermedad, sólo unos pocos casos se pueden atribuir a mutaciones específicas. El hecho de que existan casos de gemelos monocigóticos discordantes en cuanto a la aparición de la enfermedad, podría explicarse por la existencia de mecanismos epigenéticos que contribuyen al desarrollo o aparición de esta (Poulsen, Esteller et al. 2007). Estudios recientes parecen indicar que la contribución epigenética al desarrollo de la enfermedad parece ser mayor de lo que se pensaba en años anteriores (Lord and Cruchaga 2014). Entre las alteraciones epigenéticas descritas hasta la fecha, se encuentra la hipermetilación del ADN específica de promotores de

genes como *hTERT*, *ANK1*, *RPL13*, *RHBDF2* y *CDH23* (Silva, Gigek et al. 2008, Lord and Cruchaga 2014), hipometilación del ADN en algunos genes como el gen *APP* (Iwata, Nagata et al. 2014) y aumento de acetilación y fosforilación de histonas (Kilgore, Miller et al. 2010).

1.3.3.2 Diabetes Tipo-2

La diabetes Tipo-2 es una enfermedad heterogénea y compleja que se caracteriza por una hiperglucemia debida a la resistencia de los tejidos, como el músculo esquelético, grasa e hígado, a la acción de la insulina. La etiología de esta enfermedad es muy diversa, se han identificado numerosos polimorfismos relacionados (O'Rahilly 2009, Dupuis, Langenberg et al. 2010), así como factores ambientales (desarrollo embrionario, envejecimiento, obesidad,...) que aumentan la predisposición al desarrollo de la enfermedad (Fink, Kolterman et al. 1983, Hales, Barker et al. 1991, de Vegt, Dekker et al. 2001).

Alteraciones epigenéticas en los islotes pancreáticos y en los tejidos diana podrían producir una alteración de la expresión génica, influyendo en la secreción de la insulina dando lugar al desarrollo de la enfermedad (Park, Stoffers et al. 2008, Pinney, Jaeckle Santos et al. 2011, Sandovici, Smith et al. 2011, Dayeh, Volkov et al. 2014). Por ejemplo, estudios relacionan la metilación del promotor del gen *PPARGC1A* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha*) en los islotes pancreáticos y en el músculo esquelético (Ling, Del Guerra et al. 2008, Barres, Osler et al. 2009).

1.3.3.3 Enfermedades cardiovasculares

Según la OMS, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte de todo el mundo. Estudios *in vivo* con modelos experimentales parecen atribuir un papel importante a la pérdida global de metilación del ADN en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y arterioesclerosis (Baccarelli, Rienstra et al. 2010).

Además de la hipometilación del ADN, cambios post-traduccionales de las histonas se han visto asociados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, la hipertrofia cardiaca o el fallo cardiaco han sido relacionadas con cambios en la metilación de la H3K4 y la H3K9 (Kaneda, Takada et al. 2009, Stein, Jones

et al. 2011). Por otro lado, enzimas como las desacetilasas de histonas se han visto implicadas en el desarrollo de las arritmias (Montgomery, Davis et al. 2007).

1.4 Células Madre Adultas

Las células madre adultas son células multipotentes que mantienen parte de la plasticidad de las células madre embrionarias, aunque, a diferencia de estas, normalmente solo son capaces de dar lugar a un linaje celular particular (mesodérmico, endodérmico o ectodérmico) (Pittenger, Mackay et al. 1999). Se localizan en diferentes órganos y tejidos como médula ósea, sangre periférica, grasa, músculo esquelético, cerebro, piel, córnea, corazón, intestinos, hígado, epitelio ovárico, testículos,... (Figura 10). Se encuentran agrupadas en un estado quiescente que les ayuda a conservar su integridad, al mantenerse en un estado de baja tasa metabólica. Son capaces de diferenciarse a múltiples tipos celulares dependiendo de la demanda fisiológica (tras un trauma, enfermedad y durante el envejecimiento) y son autorenovables (Pittenger, Mackay et al. 1999). La capacidad de estas células para llevar a cabo el mantenimiento de tejido, depende de las propiedades del tejido en sí. Existen tejidos con alta tasa de renovación, como la sangre y el intestino, que requieren grandes poblaciones de células madre debido a la necesidad de reponerse continuamente. Por el contrario, en otros tejidos, donde la tasa de renovación es menor, las células madre adultas responden principalmente a estímulos ambientales como el daño tisular (Pollina and Brunet 2011).



Figura 10. Diferentes tejidos de los que se pueden obtener células madre adultas.

Estas células multipotentes suscitan gran interés en terapia celular y medicina regenerativa. Uno de los motivos de esto, es que el uso de estas células en clínica supone menos problemas éticos que el uso de células madre embrionarias.

Las células madre mesenquimales (MSCs, *mesenchymal stem cells*) representan un grupo de células madre adultas multipotentes que derivan de la médula ósea, grasa, hígado fetal, sangre, pulmón, cordón umbilical, placenta, etc. (Erices, Conget et al. 2000, Campagnoli, Roberts et al. 2001, Noort, Kruisselbrink et al. 2002, De Ugarte, Morizono et al. 2003, In 't Anker, Scherjon et al. 2004, Wang, Hung et al. 2004). Fueron identificadas por primera vez en los años 60 por *Friedenstein and colleagues* (Friedenstein, Piatetzky et al. 1966). Al igual que el resto de células madre, conservan la capacidad de autorrenovación y son capaces de diferenciarse a múltiples linajes celulares mesodérmicos, incluyendo hueso, cartílago, tendón, grasa y músculo (Pittenger, Mackay et al. 1999). Aunque también son capaces de dar lugar a otros tipos poblaciones celulares de origen no mesodérmico, como hepatocitos y neuronas bajo el estímulo adecuado (Bae, Park et al. 2011, Christ and Stock 2012).

Además, la biología de estas células las hace ser buenas candidatas para terapia celular (Liu and Han 2008). Poseen propiedades inmunosupresoras siendo capaces de

inhibir la respuesta inmune, tanto la respuesta innata como la adaptativa, por lo que se las conoce como células hipoinmunogénicas. El descubrimiento de sus funciones inmunosupresoras desembocó en un nuevo interés por estas células como una herramienta terapéutica para modular la inflamación y reprimir las respuestas inmunes, especialmente en enfermedades autoinmunes (Glenn and Whartenby 2014).

1.4.1 Envejecimiento en células madre adultas

Las células madre adultas, al igual que el resto de células del organismo, están sometidas a estrés ambiental y a daños intracelulares que acompañan al proceso natural del envejecimiento. En muchos tejidos, el deterioro que tiene lugar a lo largo de la vida de un organismo está en parte determinado por pérdida de funcionalidad de las células madre adultas y su capacidad de respuesta al daño (Berdasco and Esteller 2012, Signer and Morrison 2013), siendo esto uno de los marcadores del envejecimiento. Este declive viene determinado por varios factores y tiene lugar en todos los tipos de tejido (Geiger and Rudolph 2009), debido a la acumulación de errores, entre los que se incluyen alteraciones genéticas, lesiones mitocondriales, deficiencias en los mecanismos de reparación del ADN, acortamiento de los telómeros, y, también, se ha visto que la senescencia celular de las células madre adultas está regulada por mecanismos epigenéticos (Pollina and Brunet 2011). Además, se ha descrito que durante el envejecimiento tiene lugar una pérdida de quiescencia que puede dar, como consecuencia, una disminución en el número de estas (Cheung and Rando 2013). Debido a todas estas alteraciones, las células madre adultas se reducirían en número y perderían su capacidad multipotente y, por tanto, la eficacia de respuesta frente al daño y la plasticidad tisular (Pollina and Brunet 2011).

Una buena regulación de la conformación de la cromatina necesaria para llevar a cabo las diferentes funciones celulares (acceso de la maquinaria de transcripción a los genes que controlan la autorrenovación, la diferenciación, el metabolismo celular, la respuesta al daño, etc.) es esencial para el mantenimiento de las células madre adultas. Existen estudios que han identificado cambios en la expresión de reguladores de la cromatina durante el envejecimiento de células madre hematopoyéticas (Chambers, Shaw et al. 2007).

Mientras que la acetilación de histonas ha sido muy estudiada en el envejecimiento de numerosos organismos, e incluso en diferentes tejidos como el hígado y el cerebro (Shen, Sandoval et al. 2008, Kawakami, Nakamura et al. 2009, Peleg, Sananbenesi et al. 2010), los cambios en células madre adultas no han sido descritos aún.

Uno de los reguladores del complejo polycomb en células madre adultas, la proteína BMI1, se ha visto implicada en la regulación del envejecimiento de las células madre hematopoyéticas y neurales (Park, Qian et al. 2003).

Las células madre, durante el envejecimiento se convierten en mosaicos epigenéticos debido a la deriva epigenética, en los que para un determinado gen, mientras parte de la población celular no muestra metilación o niveles bajos en su región promotora, otra parte se encuentra hipermetilada (Shibata 2009). Este mosaico epigenético podría afectar la función de las células madre. Por ejemplo, algunos de los cambios de ganancia de metilación del ADN que tienen lugar debido la deriva epigenética ocurren en genes diana del complejo polycomb, como los genes *HOX*, implicados en el desarrollo y la diferenciación celular, cuyo silenciamiento podría afectar, por tanto, a la plasticidad celular y a su capacidad para diferenciarse y comprometer la función tisular (Hahn, Hahn et al. 2008, Bork, Pfister et al. 2010, Maegawa, Hinkal et al. 2010). Además, esta hipermetilación del ADN podría silenciar genes claves en el proceso de renovación celular, dando lugar a la pérdida del “*pool*” de células madre. La deriva epigenética, por tanto, podría estar implicada en la pérdida de funcionalidad de las células madre durante el envejecimiento.

Estudios previos han descrito como, a lo largo de la vida, las células madre hematopoyéticas pierden metilación de manera global en ratones (Taiwo, Wilson et al. 2013). En humanos se ha visto que, específicamente, pierden metilación en genes que se hipometilan durante la diferenciación mieloide, lo que podría estar relacionado con la pérdida de pluripotencia (Bocker, Hellwig et al. 2011). Además, se observa metilación *de novo* en genes asociados al complejo polycomb, probablemente asociado con el silenciamiento génico (Bocker, Hellwig et al. 2011, Taiwo, Wilson et al. 2013). Además, esta hipermetilación del ADN en genes del complejo ha sido relacionada con el desarrollo del cáncer (Baylin and Ohm 2006).

Al igual que ocurre con el resto de células madre, las MSCs pierden su potencial de regeneración tisular durante el envejecimiento. Se han realizado numerosos estudios funcionales *in vivo* en los que se ha visto que el potencial regenerativo de tejidos como músculo cardíaco, neural, sanguíneo es menor en MSCs de individuos de avanzada edad (Wagner, Horn et al. 2008, Chen, Yip et al. 2009, Fan, Chen et al. 2010, Hermann, List et al. 2010, Walenda, Bork et al. 2010). Pero en cuanto a los posibles cambios epigenéticos implicados en este declive, existen pocos trabajos en los que se haya tratado de caracterizar estos cambios de las MSCs durante el envejecimiento. Un estudio indica que la acetilación de la H3 juega un papel en la diferenciación y el envejecimiento de las MSCs (Li, Liu et al. 2011) y, además, se han visto cambios en el ADN relacionados con la trimetilación de H3k9 y H3k27 (Schellenberg, Lin et al. 2011). Sin embargo, estos cambios descritos están basados en cambios durante el cultivo celular prolongado, no basados en donantes de diferentes edades, y aunque los cambios que tienen lugar durante la senescencia *in vitro* y el estudio de envejecimiento *in vivo* parecen estar relacionados, probablemente los mecanismos moleculares encargados de la regulación sean distintos para cada proceso.

2. Objetivos

En la presente tesis nos planteamos el estudio de las alteraciones en la metilación del ADN que tienen lugar durante el envejecimiento en un tipo de células madre adultas, las células madre mesenquimales. Además, estudiamos la distribución de la 5-hidroximetilcitosina en el genoma de estas células madre mesenquimales, los cambios de ésta con el envejecimiento y su relación con los cambios de metilación del ADN. Por último, para validar los resultados obtenidos, pusimos a punto un método de análisis de la 5hmC utilizando la técnica de pirosecuenciación de bisulfito del ADN.

En concreto se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinar los cambios de metilación del ADN durante el envejecimiento de células madre mesenquimales.
2. Identificar la localización y la distribución en el genoma de los cambios de metilación del ADN durante el envejecimiento.
3. Determinar la existencia o no de marcas de cromatina asociadas a los cambios de metilación del ADN durante el envejecimiento.
4. Estudiar la distribución de la 5-hidroximetilcitosina en el genoma de células madre mesenquimales.
5. Determinar la existencia o no de marcas de cromatina asociadas a la 5-hidroximetilcitosina en el genoma de células madre mesenquimales.
6. Estudiar los cambios de 5-hidroximetilación del ADN durante el envejecimiento de células madre mesenquimales.
7. Identificar la localización y la distribución en el genoma de los cambios de 5-hidroximetilación del ADN durante el envejecimiento.
8. Determinar la existencia o no de marcas de cromatina asociadas a los cambios de 5-hidroximetilación del ADN durante el envejecimiento.
9. Estudiar el papel de 5hmC y su relación con 5mC, en los cambios de metilación del ADN asociados con la edad en MSCs.
10. Validar, al menos de forma parcial, los resultados obtenidos mediante pirosecuenciación de bisulfito del ADN.

3. Material y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Obtención y cultivo de células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales fueron adquiridas mediante tres vías diferentes:

- a) Compradas a Lonza (Verviers, Belgium), a Millipore (Billerica, MA, USA) y a Inbiobank (San Sebastian, Spain).
- b) Directamente obtenidas de donantes jóvenes mediante muestra de médula ósea en tubos heparinizados, tras el consentimiento informado de los pacientes.
- c) Directamente obtenidas de donantes de edad avanzada de muestras de hueso después de la implantación de una prótesis de cadera, tras el consentimiento informado de los pacientes.

En los casos b) y c), las células mononucleadas se aislaron mediante la técnica de *Ficoll-hypaque* (25 minutos de centrifugación a 400 *xg* sin freno ni acelerador); la fase superior se recuperó y se lavó dos veces con tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*) y se sedimentó. Las células fueron cultivadas en medio mínimo esencial Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) en *flask* de cultivo (Nunc, Roskilde, Denmark) a una densidad de 1.5×10^5 células/cm² y se dejaron adherir 24h.

Posteriormente, las células fueron mantenidas a 37 °C de temperatura, atmósfera de 5% de CO₂ en DMEN suplementado con 10% de SFB.

Muestra	Edad	Sexo	Pases	Estudios
MSC-1	2	F	5	mC 5hmC
MSC-2	2	F	5	mC 5hmC Validación 5hmC
MSC-3	3	F	4	mC
MSC-4	3	F	4	mC 5hmC Validación 5hmC
MSC-5	6	F	4	mC 5hmC Validación 5hmC
MSC-6	6	F	4	mC 5hmC Validación 5hmC
MSC-7	9	F	4	mC 5hmC Validación 5hmC
MSC-8	10	F	4	mC
MSC-9	10	M	5	mC
MSC-10	10	F	4	mC 5hmC
MSC-11	10	M	4	mC
MSC-12	12	F	4	mC
MSC-13	12	F	4	mC 5hmC
MSC-14	14	F	4	mC
MSC-15	18	M	4	mC
MSC-16	19	M	5	mC
MSC-17	22	M	4	mC
MSC-18	22	M	4	mC
MSC-19	22	M	6	mC
MSC-20	22	M	5	mC 5hmC Validación 5hmC
MSC-21	28	M	4	mC 5hmC
MSC-22	29	M	5	mC 5hmC Validación 5hmC
MSC-23	61	F	6	mC
MSC-24	63	M	6	mC 5hmC Validación 5hmC
MSC-25	70	F	6	mC 5hmC Validación 5hmC
MSC-26	77	F	6	mC 5hmC
MSC-27	79	F	7	mC
MSC-28	80	M	6	mC
MSC-29	86	F	6	mC 5hmC Validación 5hmC
MSC-30	87	F	6	mC 5hmC Validación 5hmC
MSC-31	87	M	6	mC
MSC-32	89	F	7	mC 5hmC
MSC-33	91	F	8	mC
MSC-34	92	F	7	mC
MSC-35	0,7	M	4	Validación mC
MSC-36	1	M	3	Validación mC
MSC-37	2	F	3	Validación mC
MSC-38	3	M	1	Validación mC
MSC-39	3	M	1	Validación mC
MSC-40	4	M	4	Validación mC
MSC-41	5	M	4	Validación mC
MSC-42	6	M	2	Validación mC
MSC-43	7	M	4	Validación mC
MSC-44	7	M	2	Validación mC
MSC-45	7	M	5	Validación mC
MSC-46	8	M	4	Validación mC
MSC-47	12	M	4	Validación mC
MSC-48	12	F	6	Validación mC

MSC-49	13	M	4	Validación mC
MSC-50	13	F	4	Validación mC
MSC-51	17	M	2	Validación mC
MSC-52	19	F	2	Validación mC
MSC-53	21	M	2	Validación mC
MSC-54	21	M	5	Validación mC
MSC-55	21	F	3	Validación mC
MSC-56	29	F	1	Validación mC
MSC-57	34	F	2	Validación mC
MSC-58	36	M	2	Validación mC
MSC-59	37	F	2	Validación mC
MSC-60	39	M	2	Validación mC
MSC-61	42	-	5	Validación mC
MSC-62	44	M	2	Validación mC
MSC-63	46	F	2	Validación mC
MSC-64	46	M	2	Validación mC
MSC-65	47	M	2	Validación mC
MSC-66	53	F	2	Validación mC
MSC-67	54	F	2	Validación mC
MSC-68	55	M	5	Validación mC
MSC-69	56	F	2	Validación mC
MSC-70	59	M	2	Validación mC
MSC-71	59	M	2	Validación mC
MSC-72	61	F	2	Validación mC
MSC-73	61	M	2	Validación mC
MSC-74	65	F	2	Validación mC
MSC-75	68	F	2	Validación mC
MSC-76	69	M	2	Validación mC
MSC-77	75	F	2	Validación mC
MSC-78	75	F	2	Validación mC
MSC-79	75	M	2	Validación mC
MSC-80	80	M	2	Validación mC

Tabla 1. Muestras de células madre mesenquimales utilizadas para esta tesis. En la tabla se indica la edad (en años), el género (masculino [M] o femenino [F]), el número de pases de cultivo y el tipo de estudio en la que se utilizaron cada una de las muestras (mC: muestras usadas para el *array* de metilación; 5hmC: muestras usadas para el *array* de 5-hidroximetilación; Validación mC: Muestras usadas para validar los *arrays* de metilación mediante pirosecuenciación de bisulfito; Validación 5hmC: Muestras usadas para validar los *arrays* de 5-hidroximetilación mediante el método de pirosecuenciación de bisulfito puesto a punto en el laboratorio).

3.2 Métodos

3.2.1 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo de las líneas celulares siguiendo un protocolo basado en la extracción de ácidos nucleicos mediante el uso de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Las muestras fueron homogeneizadas durante toda la noche con un tampón de lisis celular (NaCl 100 mM, Tris [pH8, 20 mM], EDTA [pH8, 25 mM], SDS 0.5%) y proteinasa K. Posteriormente, se incubó dos veces con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se precipitó con isopropanol. El ADN fue lavado con etanol al 70% y resuspendido con agua MiliQ estéril. El ADN extraído se cuantificó por fluorimetría (Qubit™).

3.2.2 Análisis de metilación del ADN (mC) a nivel de locus específico

3.2.2.1 Fundamento del análisis

Para el estudio de metilación a nivel de locus específico, las muestras de ADN fueron tratadas con bisulfito sódico. En presencia de este reactivo, las citosinas no metiladas se convierten en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen invariables (Furuichi, Wataya et al. 1970). Esta reacción se lleva a cabo en dos pasos: un primer paso de sulfonación en el que se forma sulfonato de citosina y, a continuación, tiene lugar una desaminación hidrolítica que da lugar a sulfonato de uracilo que, tras una desulfonación, forma uracilo, el cual, al replicarse, dará lugar a una timina (Figura 11). Por lo tanto, tras la secuenciación del ADN, un sitio CpG metilado seguirá leyéndose como CG, sin embargo, un sitio CpG no metilado se leerá como TG.

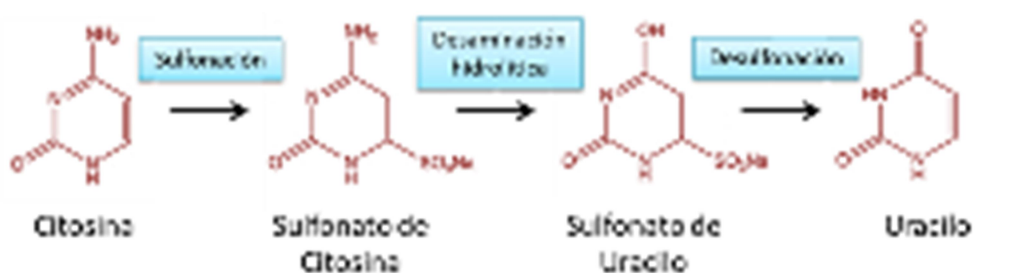


Figura 11. Conversión de bisulfito. La citosina no metilada se convierte mediante sulfonación en sulfonato de citosina y mediante una desaminación hidrolítica y posterior desulfonación pasa a ser uracilo.

El análisis de la metilación del ADN a nivel de locus específico se realizó mediante *Arrays* de metilación (más de 480.000 sondas) y pirosecuenciación de bisulfito (regiones candidatas). Las muestras de ADN fueron previamente modificadas con bisulfito sódico utilizando el sistema *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* (Zymo Research), siguiendo las recomendaciones indicadas por el fabricante.

3.2.2.2 Análisis de metilación del ADN mediante *Arrays*

Se utilizó la plataforma *Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit 450* (Illumina Inc). Esta tecnología de *microarray*, permite el estudio de unos 485000 sitios CpGs (Dedeurwaerder, Defrance et al. 2011, Dedeurwaerder, Defrance et al. 2014) que cubren el 99% de los genes de la base de datos *RefSeq*, con una media de 17 sitios CpG por región génica, distribuidos en: el promotor, extremo 5'UTR, primer exón, cuerpo de los genes y extremo 3'UTR. Esta tecnología cubre el 96% de islas CpG (incluido islas CpG fuera de regiones codificantes), tiene cobertura adicional a la orilla de islas CpG (*CpG shore island*), promotores de miRNAs y sitios CpG fuera de islas. Además, cubre sitios no-CpG (CpA, CpT y CpC) metilados en células madre embrionarias y sitios CpG diferencialmente metilados en cáncer.

La plataforma *Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit 450k* se basa en el uso de dos ensayos distintos (*Infinium I* e *Infinium II*). *Infinium I* usa dos tipos de sondas (una que identifica e hibrida con ADN metilado de la muestra, y otra que lo hace sobre el ADN no metilado), utilizando un solo color como señal de detección, mientras que *Infinium II* tiene sólo un tipo de sonda (degenerada) que identifica e hibrida con ADN metilado o no metilado indistintamente, y que diferencia utilizando dos canales de color (Figura 12).

El estado de metilación para un sitio CpG (o no-CpG en su defecto) se determina mediante el valor beta (β), un ratio que compara la señal de fluorescencia del locus metilado con la suma de las señales del locus metilado y del no metilado. Su valor oscila entre 0 (completamente no metilado) y 1 (completamente metilado).

$$\beta = \frac{\text{Max}(M, 0)}{\text{Max}(U, 0) + \text{Max}(M, 0) + 100}$$

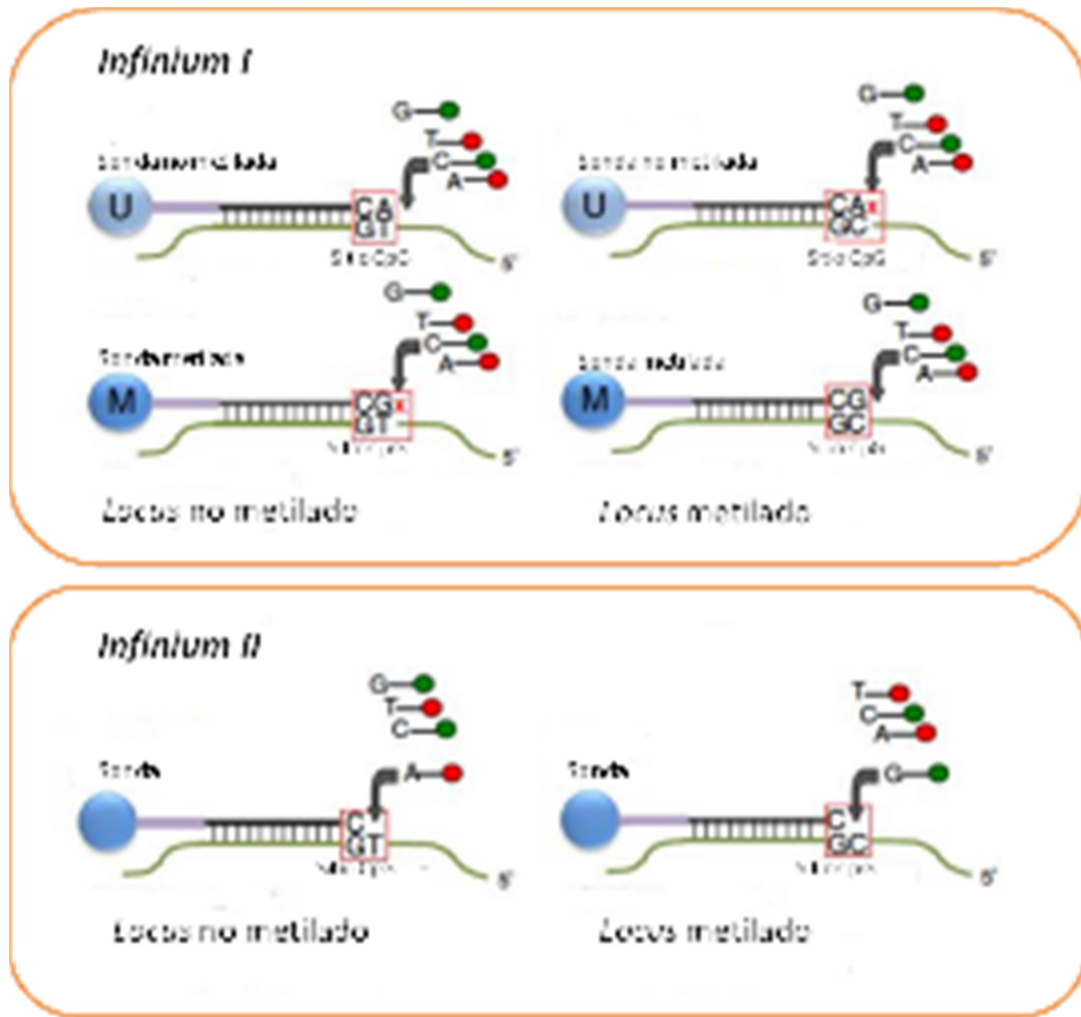


Figura 12. Tecnología *Infinium*. Arriba: *Infinium I*, usa dos tipos de sondas (una para el alelo metilado y otra para el alelo no metilado), utilizando un solo color como señal, mientras que *Infinium II* (abajo) tiene sólo una sonda para ambos alelos, los cuales diferencia usando dos colores, uno para el metilado y otro para el alelo no metilado. Figura adaptada de la web de *Illumina* (www.illumina.com)

3.2.2.3 Análisis de metilación del ADN por pirosecuenciación de bisulfito

La pirosecuenciación de bisulfito es un método que permite medir de manera cuantitativa, reproducible, rápida y fácil la metilación del ADN en regiones específicas del genoma, tanto en regiones enriquecidas en sitios CpG, como en regiones de baja densidad de CpGs (Tost and Gut 2007).

Es un método que se basa en la secuenciación del ADN, y que, teniendo en cuenta una secuencia de referencia (secuencia de interés), mide la incorporación a tiempo real de nucleótidos mediante bioluminiscencia. El material de partida es ADN modificado con bisulfito sódico, de forma que, en las posiciones donde haya un

dinucleótido CpG, se podrá cuantificar el porcentaje de incorporación de citosinas o timinas, dependiendo si la citosina estaba o no metilada.

Para analizar cada región de interés con este tipo de método es necesario diseñar 3 cebadores, 2 de amplificación mediante PCR y uno de secuenciación. Además, es necesario que uno de los cebadores utilizados para la amplificación lleve biotina incorporada en su extremo 5'. El diseño estos cebadores fue realizado mediante la herramienta *Pyrosequencing™ Assay Design Software v. 2.0.01.15*, de Biotage AB.

Una vez diseñados los cebadores específicos para cada región de interés (Tabla 2), el primer paso es la realización de una PCR de 50 ciclos para así obtener cantidad suficiente de ADN para la secuenciación. Posteriormente, la biotina incorporada en uno de los cebadores permite purificar el producto de PCR en la estación *PyroMark™ Vacuum Prep Workstation*, de Biotage AB. Esta secuencia purificada de ADN de cadena simple se utiliza junto con el cebador de secuenciación en la pirosecuenciación que se lleva a cabo en el *PyroMark™ Q24*, de Qiagen. La hebra complementaria se sintetiza en presencia de adenosina-5'-fosfosulfato (APS), luciferina y las enzimas ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa.

Gen	Secuencia (5' → 3')	Tª
<i>HAND2</i>	Fw: AGGTTAGGTTAGTTTAAGGGAGATT Rev: [BTN]TCCTACCCCAACCACTTT Seq: GGAGATTAAGATTTTATTTTGAGT	57 °C
<i>HOXA11</i>	Fw: GGAGTAGTAGTGGGTTAGATTG Rev: [BTN]AAATTTCTCCAACCTCCCTTCTTT Seq: AAATAACCTTCAAAAATAC	58 °C
<i>PITX2</i>	Fw: AGGGAGGAAGTTTGTGTATAT Rev: [BTN]CTACACTACAACCCCTTTAAACCTA Seq: ATTGGGTTAAAGTTATTTAATAAT	56 °C
<i>SIX2</i>	Fw: GGGTTGGATGATGAGTGGT Rev: [BTN]ACTCCAATTCTAACAACCACAAC Seq: ATGATGAGTGGTTTGG	60 °C
<i>TBX15</i>	Fw: TAGGGGGTTTATAGTTTGTTAAGAT Rev: [BTN]ACACAAAACACTTCCAACCTATAATAAT Seq: CCTAACAATCATCTTTTCT	58 °C

Tabla 2. Cebadores utilizados para la validación del *array* de metilación mediante pirosecuenciación de bisulfito. Fw: forward; Rev: reverse; Seq: primer de secuenciación; [BTN]: biotina; Tª: temperatura de hibridación para la PCR.

El proceso de Pirosecuenciación se inicia al agregar uno de los cuatro desoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs). Si el dNTP es complementario a la primera base no apareada en la hebra molde, la ADN polimerasa cataliza su incorporación a la cadena de ADN y libera pirofosfato (PPi). Con APS como sustrato, la ATP sulfurilasa convierte cuantitativamente el PPi recién liberado en adenosin trifosfato (ATP). Esto activa la conversión de luciferina a oxiluciferasa catalizada por luciferasa. Con esta reacción, se genera una señal de luz visible proporcional a la cantidad de ATP producido. Una cámara capta la señal y produce una gráfica denominada pirograma, la cual muestra picos de área correspondiente al número de nucleótidos incorporados. Posteriormente, la apirasa, degrada de forma continua ATP y los dNTPs no incorporados. La reacción se vuelve a iniciar con la adición de nuevos dNTPs, que son añadidos uno de cada vez, hasta completarse la secuencia.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa *PyromarkTM Q24 v2.0.6*, de *Qiagen*, obteniendo el porcentaje específico de metilación de cada dinucleótido CpG analizado.

3.2.3 Análisis de la hidroximetilación del ADN (5hmC) a nivel de locus específico

3.2.3.1 Fundamento del análisis

Como ya se ha comentado en el apartado de introducción, el análisis de metilación basado en la modificación con bisulfito sódico no es capaz de distinguir entre 5mC y 5hmC, ya que esta última también está protegida frente a la conversión por bisulfito (Jin, Kadam et al. 2010), por lo tanto, ha sido necesario desarrollar nuevas técnicas que permitan la distinción entre ambas bases.

Recientemente, Booth y colaboradores, han desarrollado un método basado en la oxidación del ADN con perrutenato potásico (KRuO₄) previa a la conversión con bisulfito sódico. Este compuesto transforma la 5hmC en 5fC y, tras la conversión con bisulfito sódico, la 5hmC se desamina a uracilo, que finalmente se leería como timina en las reacciones de secuenciación. Por tanto, el análisis de las muestras oxidadas y posteriormente modificadas con bisulfito (oxBS) revelaría los valores reales de 5mC. Para la obtención de los valores de 5hmC, cada muestra a analizar se realizó por

duplicado: por un lado la oxidación seguida de la modificación de bisulfito (muestra oxBS) y, por otro lado, la modificación de bisulfito (muestra BS). La diferencia de los valores de metilación obtenidos de ambos análisis correspondería a la fracción de 5hmC.

Para llevar a cabo el análisis de la 5hmC, mediante *Arrays* de metilación y pirosecuenciación de bisulfito, las muestras de ADN fueron preparadas mediante dos métodos distintos basados en el mismo fundamento de oxidación previa a la modificación con bisulfito. Para los *Arrays* se utilizó un kit comercial y para la pirosecuenciación se utilizó un protocolo puesto a punto por el laboratorio (Figura 13).

3.2.3.2 Análisis de 5hmC del ADN mediante *Arrays*

Utilizando 4 µg de ADN de partida, se llevó a cabo la modificación de las muestras utilizando el kit de *True Methyl™* de CEGX® siguiendo las instrucciones de uso. Brevemente, la muestra de ADN se fragmentó a 10kb utilizando tubos *g-tubes* (Covaris®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el ADN fragmentado se purificó utilizando el kit de purificación de *GeneJet™* (Thermo Fisher®). En este punto la muestra se dividió en dos para realizar por un lado la oxidación y posterior modificación de bisulfito (oxBS) y, por otro lado, únicamente la modificación con bisulfito (BS). La muestra oxBS fue nuevamente purificada utilizando una columna de intercambio de *buffer* y, posteriormente, oxidada con un *buffer* de oxidación. Por último, ambas muestras, oxBS y BS, fueron modificadas con bisulfito siguiendo las instrucciones del kit.

Como en el caso del análisis de metilación del ADN, el análisis de 5mC y 5hmC del ADN se utilizó la plataforma *Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit 450* (Illumina Inc).

3.2.3.3 Análisis de 5hmC del ADN por pirosecuenciación de bisulfito

Para llevar a cabo este análisis de la 5hmC, se ha puesto a punto en el laboratorio un método basado en otros protocolos ya descritos (Booth, Branco et al. 2012, Booth, Ost et al. 2013), que se caracteriza por ser sencillo, reproducible y de bajo coste. Consta de 3 partes: una de purificación del ADN con perlas magnéticas, otra de oxidación y modificación con bisulfito sódico, y la última de pirosecuenciación (Figura 13).

3.2.3.3.1 Purificación del ADN con perlas magnéticas

A 1 μg de ADN de partida (medido por QubitTM) de cada muestra en un volumen de 50 μL se le añadieron 1.8 volúmenes (90 μL) de *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter). Se mezcló utilizando un agitador vorticial y se incubó 20 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, se realizó un *spin* a máxima velocidad y se dejaron las muestras reposar 5 min en el *rack* magnético. Tras esto, se retiró el sobrenadante y, sin apartar del *rack*, se realizaron 3 lavados con acetonitrilo al 80% sin deshacer el sedimento. Se dejaron secar 5 min y se añadieron 50 μL de NaOH 50 mM para desnaturalizar el ADN y se incubó media hora a 37 °C. De nuevo, se realizó un *spin* a máxima velocidad y se dejaron las muestras reposar 5 min en el *rack* magnético. Se recogió cada SN en 2 tubos nuevos (24 μL de muestra a cada tubo) en hielo para proceder, inmediatamente, al siguiente paso.

3.2.3.3.2 Reacción de Oxidación y modificación de bisulfito

Para oxidar el ADN de la muestra oxBS, se añadió 1 μL de KRuO_4 a una concentración 375 mM, resuspendido en una solución de NaOH a 300mM. De manera paralela, a la muestra BS se le añadió 1 μL de agua. Se incubaron a 40 °C durante media hora y, posteriormente, se centrifugaron 10 min a 14000 *xg*.

La modificación con bisulfito sódico se llevó a cabo utilizando *Epiect bisulfite kit* (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante a excepción de la reacción de bisulfito (Tabla 3), en la cual se variaron los tiempos recomendados por la casa comercial y se hicieron por duplicado (x2) para asegurar la completa desaminación de la 5fC a uracilo, ya que no es tan rápida como la conversión de citosina y requiere mayor tiempo de reacción (Booth, Branco et al. 2012).

Paso	Condiciones sugeridas		Condiciones utilizadas		
	Tiempo	Tª	Tiempo	Tª	
Desnaturalización	5 min	95 °C	5 min	95 °C	} x2
Incubación	25 min	60 °C	20 min	60 °C	
Desnaturalización	5 min	95 °C	5 min	95 °C	
Incubación	85 min	60 °C	40 min	60 °C	
Desnaturalización	5 min	95 °C	5 min	95 °C	
Incubación	175 min	60 °C	165 min	60 °C	
Hold	∞	20 °C	∞	20 °C	

Tabla 3. Condiciones utilizadas para la reacción de bisulfito. La reacción consiste en diferentes tiempos de desnaturalización (95 °C) e incubación (60 °C). En la tabla se comparan las condiciones sugeridas por el fabricante (izquierda) con las utilizadas en nuestro protocolo (derecha), las cuales se hicieron por duplicado (x2).

3.2.3.3.3 Análisis por pirosecuenciación

Las muestras modificadas fueron analizadas mediante la técnica de pirosecuenciación de bisulfito siguiendo el mismo protocolo comentado en un apartado anterior de esta sección utilizando cebadores específicos (Tabla 4). El porcentaje de 5-hidroximetilcitosina de cada sitio CpG se obtuvo mediante la diferencia de porcentaje de la muestra BS y la oxBS.

Gen	Secuencia (5' → 3')	Tª
WVA2	Fw: AGAGTATTTTGTGGTAAAAAGGAATT Rev: [BTN] TACCCTCTACTCCCCACTTAAA Seq: GGAGTAGATGTAGTT	58 °C
KCNQ1	Fw: GGGTGTGGATGTATTTGTATGT Rev: [BTN] CTACAACACAAAAACCTCTCAC Seq: GGTTGGATGGATATT	60 °C

Tabla 4. Cebadores utilizados para la validación del *array* de 5-hidroximetilcitosina mediante pirosecuenciación de bisulfito. Fw: forward; Rev: reverse; Seq: primer de secuenciación; [BTN]: biotina; Tª: temperatura de hibridación para la PCR.

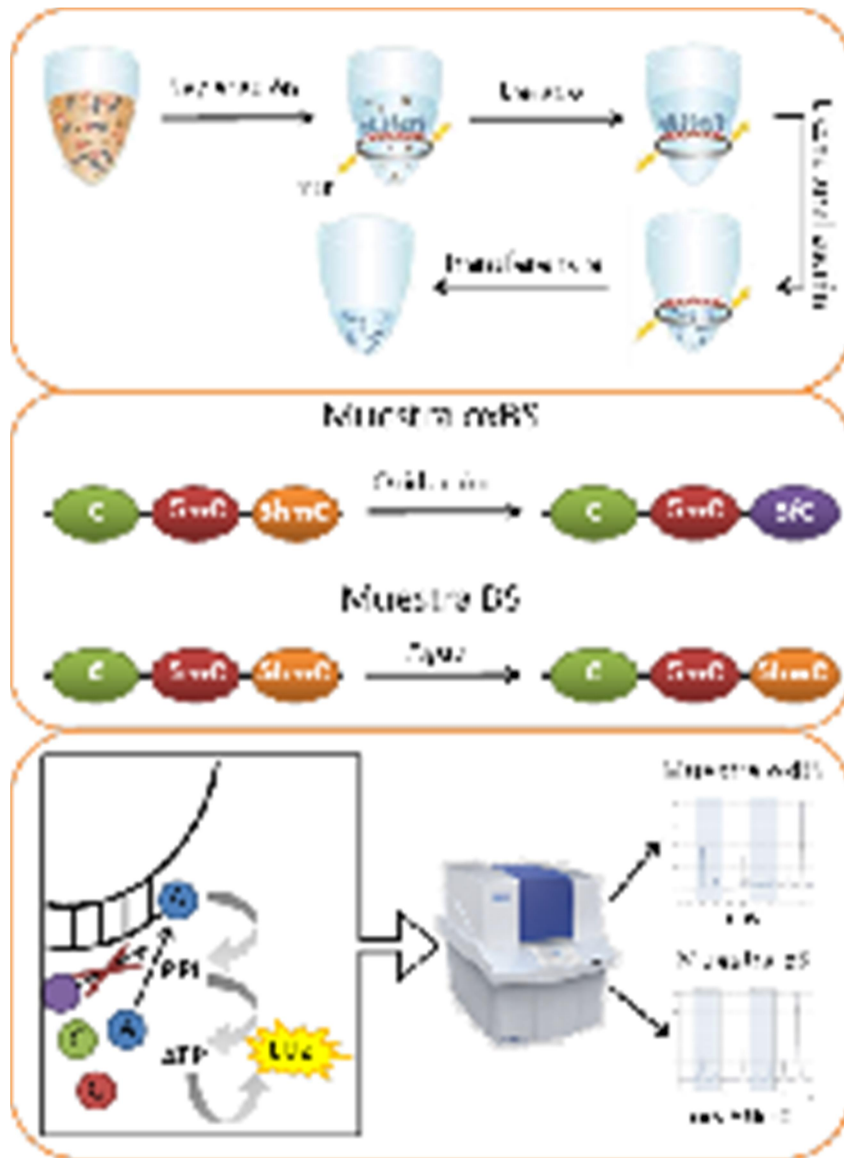


Figura 13. Fases del protocolo de pirosecuenciación de 5hmC. Panel superior: El ADN es purificado utilizando perlas magnéticas con el reactivo AMPure XP, lavado con acetonitrilo y desnaturalizado con NaOH 50mM. Panel medio: la mitad del ADN se oxida con perrutenato potásico, transformando la 5hmC en 5fC (Muestra OxBS), y se modifica posteriormente con bisulfito sódico, mientras que la otra mitad del ADN sólo se modifica con bisulfito sódico (Muestra BS). Panel inferior: ambas muestras de ADN se pirosecuencian.

3.2.4 Análisis bioinformático de los datos

3.2.4.1 Base de datos de metilación del ADN de cerebro y sangre

Se analizaron los datos de metilación del ADN de muestras de sangre (Hannum, Guinney et al. 2013) y cerebro (neuronas y glia) (Guintivano, Aryee et al. 2013) publicados en estudios previos de *arrays* de metilación del ADN mediante la herramienta *HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina®), y se utilizaron para comparar con los datos obtenidos de los análisis de las MSCs de este estudio. Se descargaron los valores beta preprocesados de metilación del ADN de la base de datos pública *Gene Expression Omnibus* (GEO; números de acceso GSE40279 y GSE41826).

3.2.4.2 Preprocesado de datos obtenidos del *array* de metilación

Los datos sin procesar (ficheros IDAT) obtenidos del *HumanMethylation450 BeadChip* fueron procesados utilizando el paquete *minfi* (version 1.12.0) de *R/Bioconductor* (Aryee, Jaffe et al. 2014). Se utilizó el método SWAN (Maksimovic, Gordon et al. 2012) para normalizar los datos obtenidos, debido a la existencia de dos tipos de sondas utilizadas en el *HumanMethylation450 BeadChip* (Figura 12). Como paso final del preproceso, se calcularon los valores beta (utilizados para interpretación y visualización de los resultados) y los valores M (utilizados para los análisis estadísticos) (Du, Zhang et al. 2010). Cada valor beta de metilación viene acompañado por un p-valor de detección para evaluar la fiabilidad de la medida y confirmar que no se trata de ruido. Se filtraron aquellas sondas en las que al menos dos muestras tenían p-valores de detección mayores de 0,01, y aquellas muestras en las que al menos 5500 sondas tenían un p-valor de detección mayor que 0,01.

En el caso del estudio de la metilación, las sondas localizadas dentro de los cromosomas sexuales (X e Y) fueron eliminadas del análisis y se utilizó la información de *SNP137 Common track* obtenida del *UCSC Genome Browser* (Sherry, Ward et al. 2001), con el fin de eliminar las sondas que se encontraban en un SNP.

Para ajustar los datos obtenidos de los *arrays* y evitar efectos lote debidos a la placa del *HumanMethylation450 BeadChip* donde se procesó cada muestra, se utilizó el método *ComBat*, el cual fue implementado en *R/Bioconductor package sva* (Leek, Johnson et al. 2012),

3.2.4.3 Cálculo de los niveles de 5hmC e identificación de sondas frecuentemente hidroximetiladas

Para calcular los valores de 5hmC, se restaron los valores beta de las muestras oxBS de su correspondiente muestra BS ($\Delta\beta$), generando así de manera artificial un conjunto de datos que representan el nivel de 5hmC para cada sonda y muestra (Stewart, Morris et al. 2015). Para identificar un conjunto de sondas CpG que estuvieran frecuentemente hidroximetiladas en el total de muestras de MSCs, se escogieron aquellas sondas cuyo valor $\Delta\beta$ fuera mayor de 0,1 y estuviera presente en más de la mitad de las muestras analizadas.

3.2.4.4 Identificación de sondas diferencialmente metiladas e hidroximetiladas

Para identificar las sondas diferencialmente metiladas e hidroximetiladas con el paso del tiempo, las muestras fueron separadas en dos grupos: jóvenes y personas de avanzada edad. Posteriormente, para cada una de las sondas se utilizó un test no paramétrico de *Wilcoxon* para detectar cambios significativos entre los grupos de edad. Los p-valores se ajustaron por el método *Benjamini-Hochberg* para el FDR (del inglés *false discovery rate*), usando como punto de corte 0,05 en caso del estudio de metilación. Para el caso del estudio de la 5-hidroximetilcitosina, el FDR utilizado al tratarse de una modificación epigenética descubierta recientemente con niveles muy bajos y un método de análisis que se encuentra en fase preliminar, fue más permisivo, del 0,25. Adicionalmente, se filtraron el 30% de las sondas con el menor tamaño del efecto, quedando, de esta manera, los cambios significativos más interesantes desde el punto de vista biológico.

3.2.4.5 Análisis de enriquecimiento de marcas específicas de histonas

Para analizar el enriquecimiento de marcas específicas de histonas en las regiones donde se localizan los conjuntos de sondas que se identificaron (ver apartados 3.2.5.3 y 3.2.5.4), se usó información proveniente del *UCSC Genome Browser Broad Histone track* del *ENCODE Project* (Rosenbloom, Dreszer et al. 2010, Rosenbloom, Dreszer et al. 2012), que contiene información de varias marcas específicas de histonas y de varias enzimas responsables del establecimiento de las

mismas, de 11 líneas celulares diferentes (datos de experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de ultrasecuenciación [ChIP-seq]).

Para determinar la existencia de asociaciones entre el conjunto de sondas de interés y cada combinación de línea celular y marca de histona, se creó una tabla de contingencia 2x2 para cada combinación, en la que todas las sondas del *array* se clasificaron en función de si pertenecían al grupo de sondas de interés o no y, a su vez, si pertenecían a una región genómica en la que se encuentra la marca de histona o no en la línea celular. Para determinar si la proporción de sondas en cada región era significativa, se utilizó un test de *Fisher* para cada combinación. Los p-valores obtenidos fueron corregidos usando el método de *Benjamini-Hochberg* (FDR), utilizando 0,05 como nivel de significación para determinar qué subconjuntos de sondas, seleccionadas mediante un criterio definido anteriormente, tenían un enriquecimiento significativo. Como medida del tamaño del efecto se utilizó el logaritmo en base 2 del *Odds Ratio* (OR).

3.2.4.6 Análisis de enriquecimiento de segmentos cromatínicos

Los datos correspondientes a los resultados de la asociación entre los diferentes conjuntos de sondas y la segmentación de la cromatina (*BROAD ChromHMM Project*), fueron obtenidos de la página web *UCSC Genome Browser*. Cada una de las *tracks* de esta base de datos representa una segmentación del genoma diferente generada mediante un modelo de Markov (HMM) creado a partir de resultados de ChIP-seq del proyecto ENCODE del código de histonas. Las segmentaciones fueron posteriormente etiquetadas según su estado genómico-funcional (Ernst and Kellis 2010, Ernst, Kheradpour et al. 2011). Para determinar si un grupo de sondas estaba enriquecido en las diferentes segmentaciones, se realizó un análisis muy parecido al realizado con las histonas. En este caso, la tabla de contingencia 2x2 se hizo utilizando cada segmento de la cromatina en vez de la marca de histonas, utilizando un test de *Fisher* nuevamente. Al igual que con las histonas, los p-valores se corrigieron mediante el método de *Benjamini-Hochberg* (FDR), utilizando 0,05 como nivel de significación. Como medida del tamaño del efecto se utilizó el logaritmo en base 2 del OR.

3.2.4.7 Análisis de región genómica donde se localizan las sondas

A cada sonda del *array* se le asignó una región genómica determinada de acuerdo con su posición relativa a la información extraída del paquete de *R/Bioconductor TxDb.Hsapiens.UCSC. hg19.knownGene* (Version 3.0.0) que contiene la información sobre todos los genes que hay en la base de datos de la UCSC, realizándose la siguiente división de regiones: promotor (2kpb antes del inicio de transcripción), 5'UTR, primer exón, exón, intrón, 3'UTR e intergénica. En el caso de que alguna de las sondas perteneciera a más de una categoría, se asignó a la primera categoría según han sido mencionadas en la frase anterior.

Para analizar si un conjunto de sondas se localizaba de forma preferente en una región genómica concreta, se creó una tabla de contingencia que enfrentaba la pertenencia o no al conjunto de interés con la pertenencia a cada una de las categorías. Mediante Chi-cuadrado se determinó la existencia o no de cambios entre las proporciones de las sondas dentro conjunto de interés y fuera de él, utilizando 0,05 como nivel de significación. Se utilizó el OR para medir el tamaño del efecto.

3.2.4.8 Análisis de estado de islas CpG donde se localizan las sondas

La locación de las islas CpG usada en el análisis se obtuvo del paquete *FDb.InfiniumMethylation.hg19* (Triche, Weisenberger et al. 2013) del *R/Bioconductor*. Cada sonda fue asignada a una sola categoría: Isla CpG, CpG *shore island*, CpG *shelf island* o no isla CpG. Para cada conjunto de interés se creó una tabla de contingencia de 4x2 con el fin de estudiar la posible asociación entre cada grupo de sondas de interés y las diferentes categorías. Para determinar si el grupo de sondas a estudio tenía una asociación significativa con alguna de las categorías se utilizó un test *Chi-cuadrado*. Posteriormente, para cada categoría, se construyó una nueva tabla de contingencia de 2x2 y se realizó un nuevo test Chi-cuadrado que nos permitió valorar el cambio proporcional correspondiente a cada categoría. Como medida del tamaño del efecto de cada test individual se utilizó el OR.

3.2.4.9 Análisis de densidad de CpGs donde se localizan las sondas

La densidad de CpGs en la región genómica donde se localizan cada una de las sondas del *HumanMethylation450 microarray*, se ha calculado como el número de

“CG” presentes, divididas por el número máximo de “CG” posibles en una ventana de 2kpb, centrada en la CpG analizada. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las densidades de CpGs en las regiones donde se localizaban los diferentes conjuntos de sondas, se realizó un test no paramétrico de *Wilcoxon*, utilizando 0,05 de nivel de significación para todos los test. El tamaño del efecto fue medido usando Delta de *Cliff* (D), el cual permite cuantificar la magnitud de la diferencia entre dos grupos de observaciones.

3.2.4.10 Análisis de distancias de las sondas respecto a telómeros y centrómeros

La distancia a telómeros y centrómeros fue medida para cada una de las sondas del *HumanMethylation450 microarray*. Nuevamente, para determinar si existían diferencias significativas entre las densidades de los diferentes conjuntos de sondas, se realizó un test no paramétrico de *Wilcoxon*, utilizando 0,05 de nivel de significación para todos los tests. El tamaño del efecto fue medido usando Delta de *Cliff* (D).

4. Resultados

Parte I

4.1 Cambios de metilación del ADN en mesenquimales

4.1.1 Cambios de metilación del ADN durante el envejecimiento en MSCs

Para identificar posibles cambios de metilcitosina (mC) relacionados con la edad en MSCs, se analizaron, mediante la herramienta *HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina®), los valores de metilación de sitios CpGs, localizados en 485577 sondas, de los cuales, tras varios filtrados (ver material y métodos), se compararon los niveles de esta modificación en 429789 sitios CpG de 34 muestras de donantes divididas en dos grupos de edad: muestras obtenidas en individuos jóvenes (edades comprendidas entre 2 y 29 años) y obtenidas de individuos de edad avanzada (edades comprendidas entre 61 y 91 años). Mediante un test no paramétrico de Wilcoxon (ver material y métodos), se identificaron 64142 sitios CpG diferencialmente metilados (dmCpG) entre ambos grupos ($FDR < 0,05$), de los cuales 18735 (29,20%) ganaban (hipermC) y 45407 (70,80%) perdían metilación (hipomC) con la edad. El agrupamiento jerárquico de todas las muestras utilizando únicamente las dmCpGs, mostró dos bloques diferenciados y relacionados con el rango de edad de los individuos (Figura 14A). La comparación directa entre una muestra representativa de cada grupo de edad (2 años *versus* 87 años), utilizando las dmCpG, mostró unos niveles de metilación mayores en la muestra de menor edad (Figura 14B).

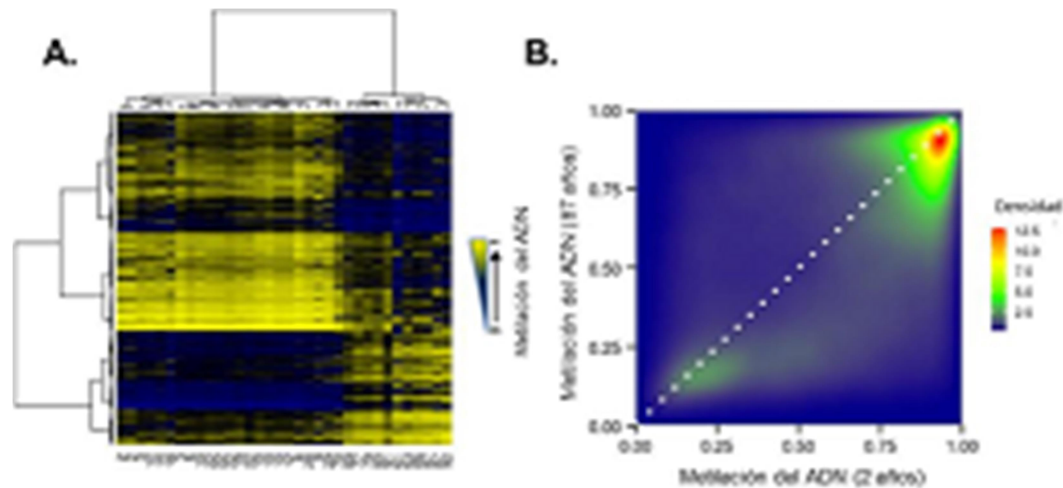


Figura 14. A. Agrupación jerarquizada de las muestras utilizando los 15000 sitios dmCpGs con mayor variación entre jóvenes y personas de avanzada edad. Los valores medios de metilación se muestran de 0 (azul) a 1 (amarillo). B. *Plot* de densidad donde se compara la metilación de los sitios dmCpGs de una muestra joven (2 años) y una de avanzada edad (87 años) de MSCs.

Para validar los resultados obtenidos en el *array* de metilación, se eligieron de forma aleatoria 5 secuencias que contenían, al menos, un sitio CpG identificado como diferencialmente metilado con la edad. Mediante pirosecuenciación de bisulfito se obtuvo información del estado de metilación de 950 sitios CpG de una cohorte independiente de 46 muestras de MSCs obtenidas de individuos de edades comprendidas entre 7 meses y 80 años. Los sitios CpGs analizados se localizaron en regiones asociadas a los genes *Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2 (HAND2)* y *SIX Homeobox 2 (SIX2)* (CpGs hipermetiladas), y los genes *T-Box 15 (TBX15)*, *Paired-Like Homeodomain 2 (PITX2)* y *Homeobox A11 (HOXA11)* (CpGs hipometiladas). Al analizar estos sitios CpG utilizando la técnica de pirosecuenciación de bisulfito, todas las regiones de ADN seleccionadas presentaron la misma tendencia de cambio con la edad, observada previamente en el *arrays* de metilación: hipermetilación en el caso de *HAND2* y *SIX2* e hipometilación en el caso de *TBX15*, *PITX2* y *HOXA11* durante el envejecimiento (Figura 15).

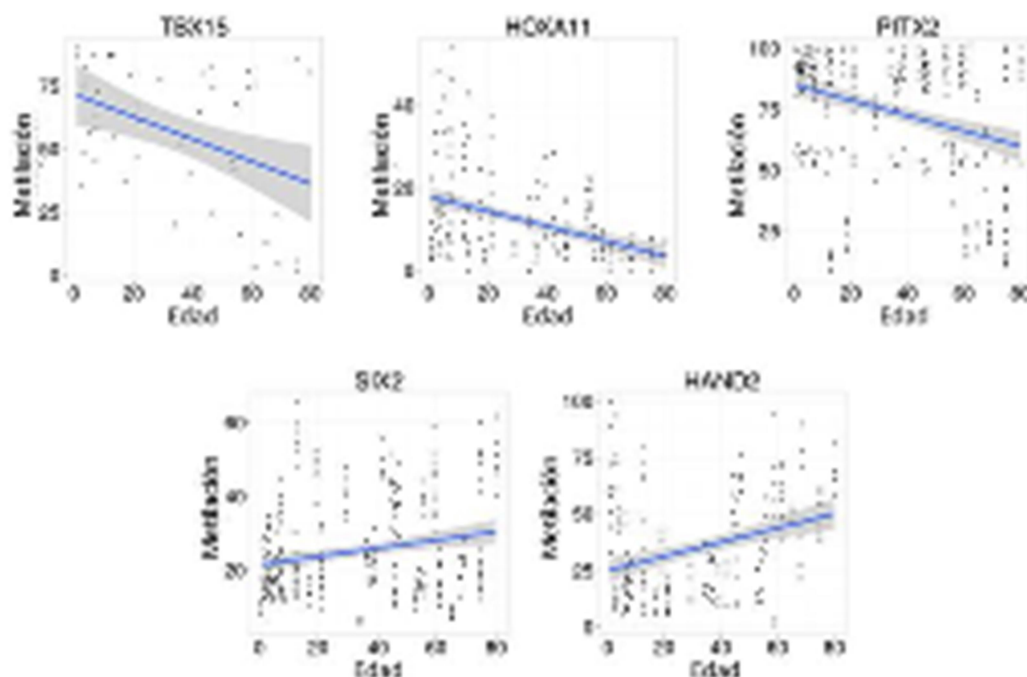


Figura 15. Ejemplos de sitios CpG asociados a genes específicos que cambian con el envejecimiento, validados mediante pirosecuenciación en una cohorte independiente de muestras de MSCs. Para cada uno de los genes se muestra un gráfico de dispersión con el porcentaje de metilación de cada muestra y cada sitio CpG. En la parte superior se muestran tres genes que se hipometilan y en la parte inferior dos genes que se hipermetilan con el envejecimiento. Cada punto se corresponde con el porcentaje de metilación de un sitio CpG de una muestra. La línea azul se corresponde con la línea de tendencia y el sombreado gris con el intervalo de confianza al 0.95 del modelo ajustado.

4.1.2 Caracterización de las dmCpGs desde el punto de vista genómico-funcional

Para estudiar las características de las dmCpGs en MSCs, desde el punto de vista genómico, y su posible efecto funcional, realizamos un análisis bioestadístico que nos permitiera identificar la localización de estos sitios CpGs en diferentes tipos de islas CpGs y diferentes regiones génicas (ver material y métodos).

4.1.2.1 Densidad de los sitios dmCpGs

Tanto los sitios hiper como hipomC se localizan preferentemente en regiones genómicas de baja densidad de CpGs (Test no paramétrico de Wilcoxon; p valor $< 0,001$, $D=-0,33$ en el caso de los sitios hiper mC y p valor $< 0,001$, $D=-0,21$ para los sitios hipomC) (Figura 16A). En línea con esta observación, ambos, hiper e hipomC estaban preferentemente enriquecidos fuera de islas CpG (Test chi-cuadrado test; $p < 0,001$, $OR=2,58$ y $p < 0,001$, $OR=1,76$, respectivamente) (Figura 16B).

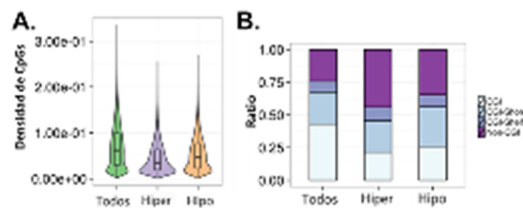


Figura 16. A. Diagramas de violín mostrando la densidad de CpGs de los sitios hiper e hipometilados con la edad en MSCs (hiper e hipo) en comparación con la densidad de CpGs de las CpGs analizadas en el *array* (Todos). B. Gráfico de barras en el que se representa la distribución de los sitios que ganan (hiper) y pierden (hipo) metilación con el tiempo en comparación con la distribución de todas las CpGs analizadas en el *array* (Todos), según su localización con respecto a islas CpGs: dentro de islas (CGI), CpG *shore* (CGI Shore), CpG *shelf* (CGI shelf) y fuera de islas (Non-CGI).

4.1.2.2 Localización cromosómica de los sitios dmCpGs

Para determinar la localización cromosómica de los sitios dmCs, se analizó la su distancia a centrómeros y a telómeros. Los resultados obtenidos reflejaron que tanto los sitios hiper como los hipomC se encontraban alejados de los centrómeros (Test no paramétrico de *Wilcoxon*; p valor $< 0,001$, $D=0,051$ y p valor $< 0,001$, $D=0,048$, respectivamente) y cerca de los telómeros (Test no paramétrico de *Wilcoxon*; p valor $< 0,001$, $D=-0,072$ y p valor $< 0,001$, $D=-0,071$, respectivamente) (Figura 17).

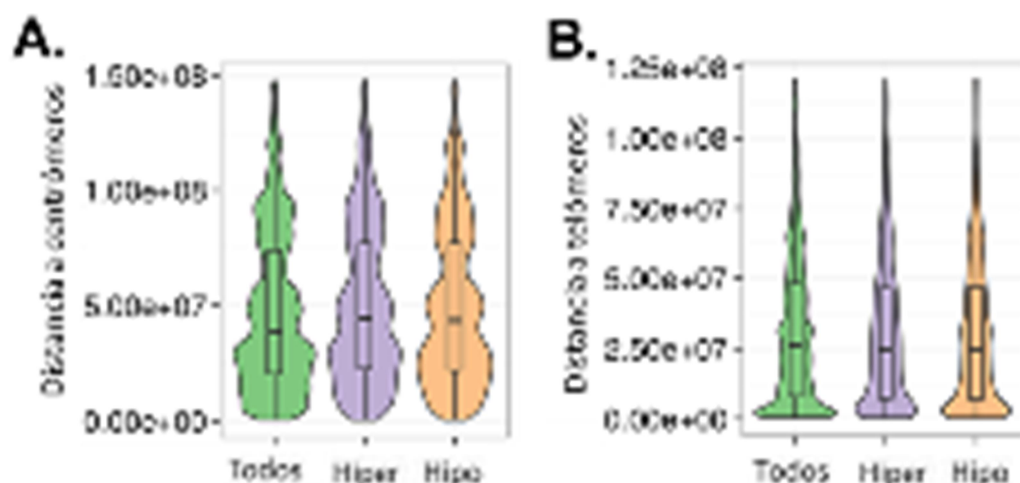


Figura 17. Diagramas de violín mostrando la distancia a centrómeros (A.) y a telómeros (B.) de los sitios hiper e hipomC en comparación con las distancias de todas las CpGs analizadas

4.1.2.3 Localización genómica de las dmCpGs

Para determinar la localización genómica de los sitios dmCpG, se dividió el genoma en las siguientes partes: promotores, regiones 5' UTR, primeros exones, exones, intrones, regiones 3' UTR y regiones intergénicas, y se comparó, mediante chi-cuadrado, la localización en cada una de estas regiones de los sitios dmCpG respecto a todas las sondas del *array*. Ambos, hiper e hipomC, se encontraban enriquecidos en regiones intergénicas (test chi-cuadrado; $p < 0,001$, OR=1,60 y $p < 0,001$, OR=1,37, hiper5hmC e hipo5hmC, respectivamente) e intrones (test chi-cuadrado; $p < 0,001$, OR=1,49 y $p < 0,001$, OR=1,49, respectivamente) y empobrecidos en promotores (test chi-cuadrado; $p < 0,001$, OR=0,5 y $p < 0,001$, OR=0,6, respectivamente), 5'UTR (test chi-cuadrado; $p < 0,001$, OR=0,56 y $p < 0,001$, OR=0,52, respectivamente) y primer exón (test chi-cuadrado; $p < 0,001$, OR=0,63 y $p < 0,001$, OR=0,59, respectivamente) (Figura 18).

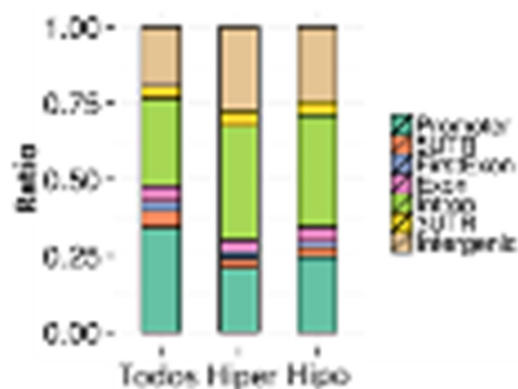


Figura 18. Gráfico de barras de la distribución genómica de los sitios que ganan (hiper) y pierden (hipo) metilación con el tiempo, en comparación con la distribución de todas las CpGs analizadas en el *array* (Todos).

4.1.3 Cambios de metilación comunes a otros tipos celulares

Posteriormente, se procedió a determinar la existencia de cambios comunes durante el envejecimiento entre los que tienen lugar en MSCs con aquellos que ocurren en otros tipos celulares terminalmente diferenciados, cómo células sanguíneas y nerviosas (neuronas y glía) publicados anteriormente (Guintivano, Aryee et al. 2013, Hannum, Guinney et al. 2013). De los 64142 sitios dmCpG en MSCs, 42 sitios y 38 sitios CpG se hipo e hipermetilaban, respectivamente, comúnmente en neuronas, glía y células sanguíneas (Figura 19).

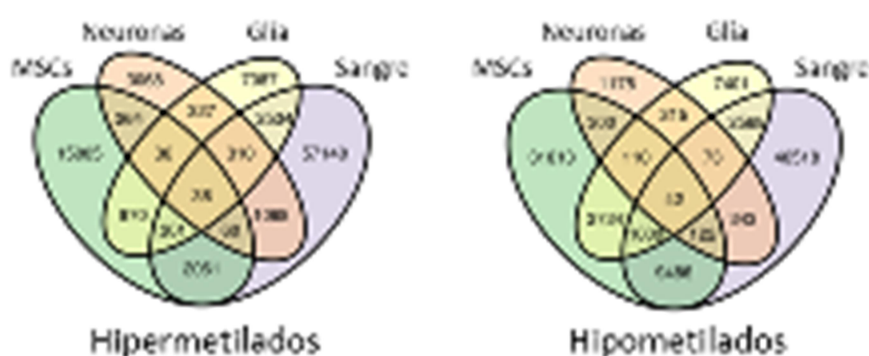


Figura 19. Diagramas de VENN mostrando el número de sitios CpGs Hiper (izquierda) e Hipometilados (derecha) que cambian con el tiempo en los diferentes tipos celulares: MSCs, Neuronas, Glía y células sanguíneas. El número de sitios CpGs comunes a todos es de 38 sitios CpG para el aumento de metilación del ADN con la edad y de 42 sitios comúnmente hipometilados durante el envejecimiento

4.1.4 Asociación de las dmCpGs con marcas de la cromatina

Para identificar posibles asociaciones entre la hipermetilación del ADN durante el envejecimiento en células madre adultas y las diferentes marcas post-traduccionales de las histonas, se compararon los sitios hipermetilados con datos de ChIP-seq previamente publicados de marcas de histonas y los enzimas implicados en llevar a cabo estas modificaciones de 10 líneas celulares diferentes (ver material y métodos). Mediante este análisis, se encontró un enriquecimiento, estadísticamente significativo, de los sitios CpG hipermetilados en regiones del genoma con las marcas de histonas represivas H3K9me3, y H3K27me3 y su metiltransferasa *EZH2* (Test de Fisher; $p < 0,001$) (Figura 20).

Para determinar si estas observaciones podrían extrapolarse a otros tipos de células terminalmente diferenciadas, se utilizó la misma herramienta para analizar marcas de cromatina asociadas a sitios CpG que se hipermetilan durante el envejecimiento en células sanguíneas, neurales y de la glía (Guintivano, Aryee et al. 2013, Hannum, Guinney et al. 2013). Al igual que en MSCs, los sitios CpG hipermetilados con la edad en cerebro y sangre estaban enriquecidos en las mismas marcas post-traduccionales de histonas H3K9me3, y H3K27me3 y su metiltransferasa *EZH2*, lo que podría indicar un papel importante de las marcas de histonas en la hipermetilación del ADN durante el envejecimiento, independientemente del tipo de tejido. Además, los 38 sitios CpG hipermetilados comunes en sangre, cerebro y MSCs presentaron una asociación estadísticamente significativa a las mismas marcas represivas de histonas y a la metiltransferasa *EZH2* (Figura 20).

Para identificar marcas post-traduccionales de histonas asociadas al conjunto de sitios CpGs hipometilados con la edad en MSCs, se compararon los sitios hipometilados con los mismos datos de ChIP-seq utilizados para la comparación con sitios hipermetilados. Mediante este análisis, se determinó una fuerte asociación entre los sitios hipometilados y la marca activadora de histonas H3K4me1. Al igual que ocurría con los sitios hipermetilados con la edad, la asociación entre los sitios hipometilados de MSCs y la modificación post-traduccional H3k4me1 se puede extrapolar a otros tipos celulares terminalmente diferenciales como neuronas, glía y células sanguíneas en los que también se observó una fuerte asociación entre la hipometilación asociada a la edad y

la marca de histonas H3k4me1. Además, los 42 sitios CpG comúnmente hipometilados durante el envejecimiento en células sanguíneas, neuronas, glia y MSCs, se encontraron, igualmente, enriquecidos en la H3K4me1 (FDR<0,05) (Figura 20).

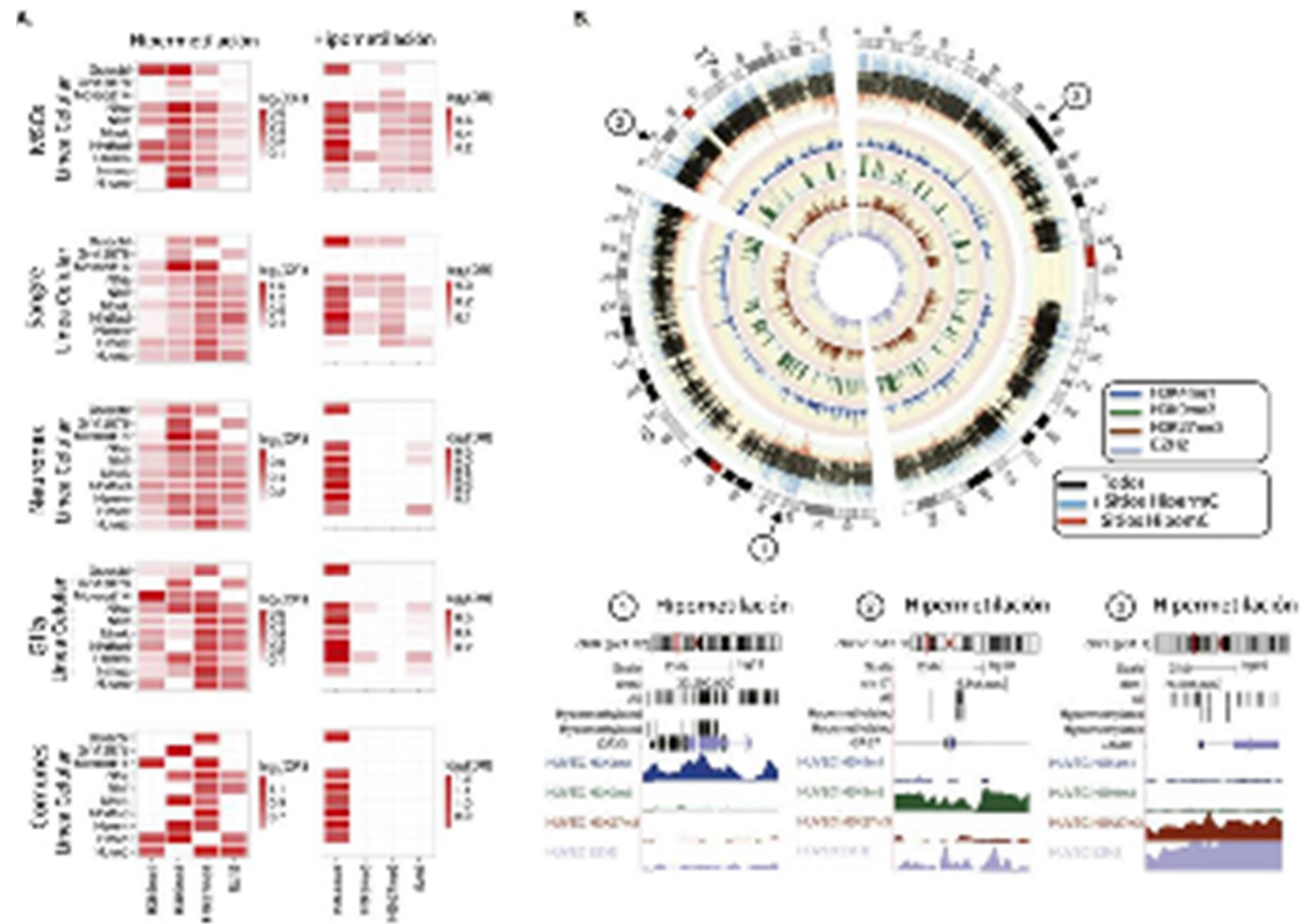


Figura 20. Marcas de histonas asociadas con los cambios de metilación del ADN durante el envejecimiento. A. *Heatmaps* en los que se muestra el enriquecimiento en los sitios CpG hiper e hipomC de MSCs, sangre, neuronas, glia y comunes de las diferentes marcas post-traduccionales de histonas y los enzimas implicados en ellas del *UCSC Genome Browser Broad Histone track* del proyecto ENCODE. El código de color representa el enriquecimiento basándose en el logaritmo en base 2 del *odds ratio*. B. Representación circular de tres cromosomas (1, 6 y 17), indicando los sitios CpG que se hipermetilan (azul) e hipometilan (rojo) en MSCs. Las *tracks* inferiores representan diferentes marcas de cromatina (H3K4me1, H3K9me3, H3K27me3 y EZH2) de células HUVEC. En la parte inferior se muestran 3 ejemplos representativos de regiones de 200 kpb en las que se ve asociación entre cambios de metilación y marcas de histonas.

Parte II

4.2 Estudio de la 5hmC en MSCs

Durante la ejecución del proyecto de investigación descrito en el apartado anterior, surgió una nueva metodología de análisis utilizando los mismos arrays de metilación de Illumina, que permite discriminar entre la 5mC y la 5hmC. En breve, se realiza una oxidación previa de las muestras, que posteriormente se modifican con bisulfito, en paralelo con las mismas muestras sin oxidar. Así, para identificar la 5hmC, cada muestra se debe analizar por duplicado tras haber sido tratada con bisulfito (BS), u oxidada y tratada con bisulfito (oxBS). Para ello se utilizó el kit de True Methyl™ de CEGX, en combinación con arrays de metilación 450K de Illumina. Tanto las muestras BS como las oxBS se hibridaron en arrays de metilación de 450K en el equipo de la Unidad de Genotipado del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid. Los valores obtenidos en el array de la muestra oxBS reflejarán la verdadera 5mC, mientras que la diferencia entre los valores de la muestra BS y la oxBS se corresponderán a la 5hmC (ver materiales y métodos).

4.2.1 Distribución genómica de 5hmC en células madre mesenquimales

Para el estudio de la distribución de la 5hmC en MSCs, se analizaron, mediante la herramienta *HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina®), los valores de metilación de sitios CpGs, localizados en 485577 sondas, de los cuales, tras un filtrado (ver material y métodos), se compararon los niveles de esta modificación en 479423 sitios CpG en muestras obtenidas de 17 individuos de edades comprendidas entre 2 y 89 años. Cada muestra fue modificada por duplicado: con bisulfito sódico (BS) y con un agente oxidante seguido de la conversión por bisulfito sódico (oxBS) (ver materiales y métodos). Mientras que los valores β de la muestra BS se correspondían con la suma de 5hmC y 5mC (mC), los valores β de la muestra oxBS se correspondían únicamente con los valores de la 5mC. Calculando las diferencias de los valores β entre las modificaciones BS y oxBS ($\Delta\beta$) de cada muestra, se obtuvieron los valores correspondientes a la 5hmC de cada sitio CpG (Stewart, Morris et al. 2015).

Para determinar el perfil de distribución de la 5hmC en MSCs seleccionamos aquellos sitios CpG con valores de 5hmC superiores a 0,1 ($\Delta\beta > 0,1$). Mediante esta estrategia, se identificaron un total de 134693 sitios CpG hidroximetilados en al menos una de las muestras (entre 15761 y 42392 sitios CpG hidroximetilados por muestra), de los cuales, 10685 CpGs eran comunes a más del 50% de las muestras. Para determinar el perfil genómico de distribución de la 5hmC en MSCs, se compararon los sitios frecuentemente hidroximetilados (FhmC) con las CpGs analizadas en el *array* y, mediante esta comparación, se determinó la mayor o menor densidad de CpGs, la distancia a centrómeros y telómeros y la localización genómica de los sitios FhmC con respecto a las sondas del *array*.

4.2.1.1 Densidad de CpGs de los sitios FhmC

Los sitios FhmC se localizan preferentemente en regiones genómicas de baja densidad de CpGs (Test no paramétrico de Wilcoxon; pvalor < 0,001, D=-0,47) (Figura 21A). En línea con esta observación, la 5hmC se encontraba enriquecida en regiones fuera de islas CpG (test chi-cuadrado; pvalor<0,001, OR=3,62) y empobrecida dentro de ellas (test chi-cuadrado; pvalor<0,001, OR=0,21) (Figura 21B).

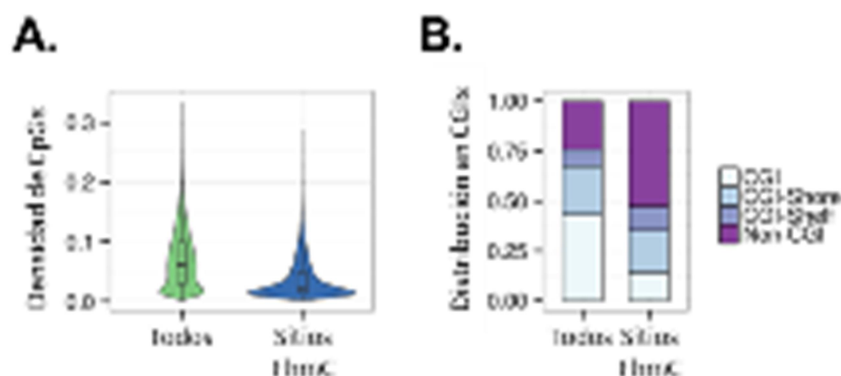


Figura 21. A. Diagramas de violín mostrando la densidad de CpGs en zonas donde hay 5hmC en más del 50% de las muestras (sitios FhmC) en comparación con la densidad de CpGs de todas las CpGs analizadas en el *array* (Todos). B. Gráfico de barras de la distribución de los sitios FhmC en comparación con todas las CpGs analizadas en el *Array* con respecto a islas CpG: dentro de islas (CGI), CpG *shore* (CGI Shore), CpG *shelf* (CGI shelf) y fuera de islas (Non-CGI).

4.2.1.2 Localización cromosómica de los sitios FhmC

Para determinar la localización cromosómica de la 5hmC, se analizó la distancia a centrómeros y a telómeros de los sitios CpG frecuentemente hidroximetilados. Los resultados obtenidos reflejaron que los sitios FhmC se encontraban alejados tanto de los centrómeros como de los telómeros, comparado con las CpGs analizadas en el *array* (Test no paramétrico de *Wilcoxon*; p valor $<0,001$ en ambos casos), aunque las diferencias entre las distancias eran pequeñas ($D=0,01$ and $D=0,06$, respectivamente) (Figura 22).

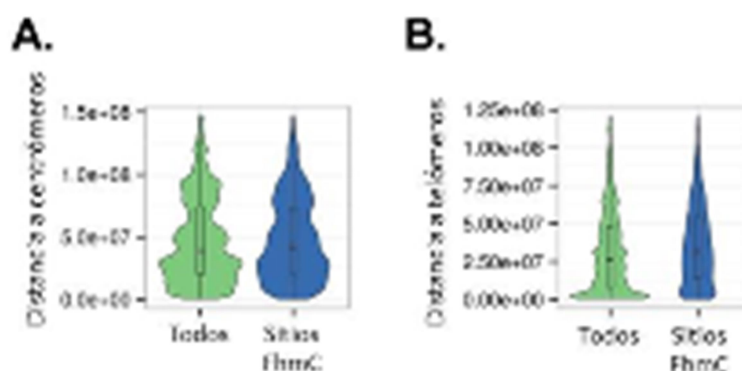


Figura 22. Diagramas de violín mostrando la distancia a centrómeros (A.) y a telómeros (B.) de los sitios FhmC en comparación con las distancias de todas las CpGs analizadas en el *array*.

4.2.1.3 Localización genómica de las FhmC

Para determinar la localización genómica de los sitios FhmC, se comparó la localización de los sitios FhmC respecto a la de las sondas del *array* en cada una de las regiones genómicas (promotores, regiones 5' UTR, primeros exones, exones, intrones, regiones 3' UTR y regiones intergénicas) mediante chi-cuadrado. El análisis de los resultados mostró que la 5hmC estaba enriquecida en intrones (test chi-cuadrado; $p<0,001$, OR=1,63), regiones intergénicas (test chi-cuadrado; $p<0,001$, OR=1,48) y regiones 3'UTR (test chi-cuadrado; $p<0,001$, OR=1,40). Por el contrario se observó un empobrecimiento en promotores (test chi-cuadrado; $p<0,001$, OR=0,55), regiones 5'UTR (test chi-cuadrado; $p<0,001$, OR=0,35), primeros exones (test chi-cuadrado; $p<0,001$, OR=0,53), y exones (test chi-cuadrado; $p<0,001$, OR=0,58) (Figura 23).

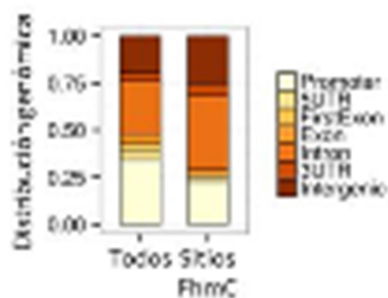


Figura 23. Gráfico de barras de la distribución genómica de los sitios FhmC en comparación con la distribución de todas las CpGs analizadas en el *array*.

4.2.2 Asociación de los sitios FhmC con la cromatina

Para identificar posibles asociaciones entre la 5hmC de células madre adultas y las diferentes marcas post-traduccionales de las histonas, se compararon los sitios FhmC con datos previamente publicados de modificaciones de histonas y enzimas implicados en llevar a cabo estas modificaciones de 10 líneas celulares diferentes (ver métodos). Mediante este análisis, se encontró una asociación estadísticamente significativa (test de Fisher; $p < 0,05$) con la marca activa de histonas H3K4me1, preferentemente, y, también, con la marca represiva H3K9me3 (Figura 24A y B).

Para estudiar el estado de la cromatina en regiones donde se localizaban los sitios FhmC, además de los análisis anteriores (Figura 24A y B), se utilizó una base de datos basada en las diferentes segmentaciones de la cromatina generadas con un modelo de Markov (HMM) de resultados de ChIPseq del proyecto del código de histonas ENCODE. Este modelo relaciona las diferentes marcas de histonas con estados de la cromatina (promotores, intergénicos activos, transcritos, represivos y repetitivos), asignando a cada uno una interpretación funcional biológica (promotores, *enhancers*, aisladores, dominios represivos, regiones espaciadoras transcritas). Estas segmentaciones se relacionaron y etiquetaron de acuerdo con su estado funcional (Ernst and Kellis 2010, Ernst, Kheradpour et al. 2011). Al comparar sitios FhmC con los distintos estados de la cromatina, observamos que la 5hmC estaba asociada a *enhancers* (test de Fisher; $p < 0,05$) (Figura 24C), que a su vez están estrechamente relacionados con la marca de histona H3K4me1 (Ernst and Kellis 2010).

4.2.3 Cambios de 5-hidroximetilcitosina durante el envejecimiento en MSCs

Para identificar posibles cambios de 5hmC relacionados con la edad en MSCs, se compararon los niveles de esta modificación química del ADN en dos grupos de muestras: las obtenidas de individuos jóvenes (edades comprendidas entre 2 y 29 años) y las obtenidas de individuos de edad avanzada (edades comprendidas entre 63 y 89 años), mediante un test no paramétrico de Wilcoxon (ver material y métodos). Utilizando esta estrategia, se identificaron 1631 sitios CpG diferencialmente hidroximetilados (d5hmC) entre ambos grupos ($FDR < 0,25$) (ver materiales y métodos), de los cuales 785 (48,13%) ganaban (hiper5hmC) y 846 (51,87%) perdían hidroximetilación (hipo5hmC) con la edad (Figura 25A). Al realizar una agrupación jerarquizada de las muestras utilizando estos sitios d5hmC, los individuos se agruparon acorde con su grupo de edad (Figura 25B). La comparación directa entre la metilación de 5hmC de la muestra más joven y la de mayor edad no mostró cambios aparentes de la modificación con la edad (Figura 25C).

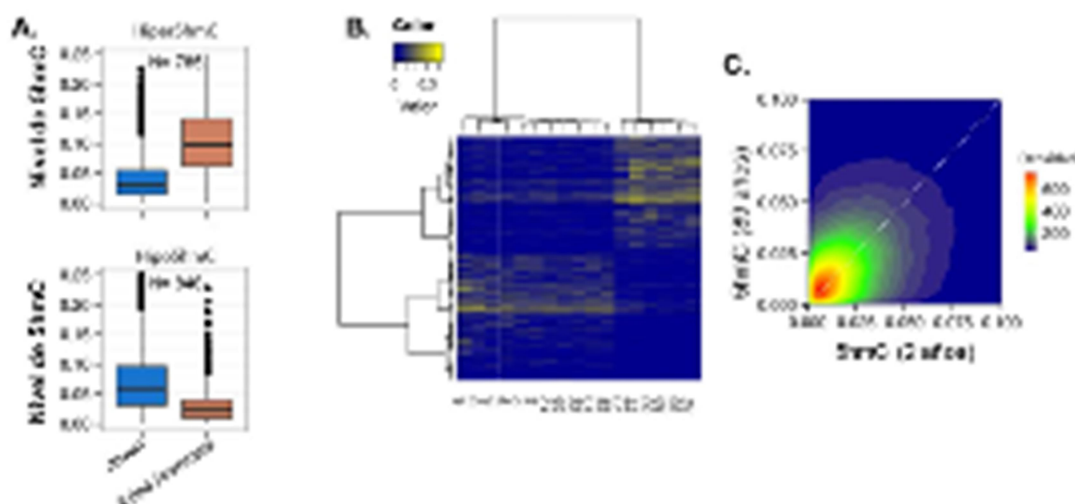


Figura 25. Cambios de 5hmC en los diferentes grupos de edad. A. Diagramas de caja mostrando los cambios de 5hmC durante el envejecimiento obtenidos del test no paramétrico de *Wilcoxon*, y comparando grupos de muestras de distinta edad. CpGs Hiperhidroximetiladas con la edad (arriba) y CpGs hipohidroximetiladas con la edad (abajo). B. Agrupación jerarquizada de las muestras utilizando los sitios d5hmCpGs. Los valores medios de 5-hidroximetilación se muestran de 0 (azul) a 0.5 (amarillo). C. *Plot* de densidad comparando la metilación los sitios d5hmCpGs de una muestra joven (2 años) y

Para validar los resultados obtenidos con los *arrays* de metilación, se puso a punto una técnica de pirosecuenciación de bisulfito para muestras previamente oxidadas con perrutenato potásico que permitiese estudiar los niveles de 5hmC en regiones específicas del ADN. Para ello, se seleccionaron dos sitios CpG (cg04689606, localizado en un intrón del gen *Von Willebrand Factor A Domain Containing 2* [VWA2], y cg09197492, localizado en un intrón del gen *Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q, Member 1* [KCNQ1]), que presentaban cambios significativos de 5hmC asociados con la edad. Los resultados obtenidos mediante la técnica de pirosecuenciación de bisulfito mostraron que, al igual que habíamos observado en los *arrays* de metilación, los niveles de 5hmC en la posición cg04689606 eran menores en células madre obtenidas de individuos de avanzada edad que en aquellas obtenidas de individuos jóvenes (Test no paramétrico de *Wilcoxon*; pvalor = 0,02), mientras que los niveles de 5hmC en la posición cg04689606 aumentaban con la edad (Test no paramétrico de *Wilcoxon*; pvalor < 0,01) (Figura 26). Por tanto, estos resultados confirman, al menos de forma parcial, los resultados obtenidos en el *array* de metilación.

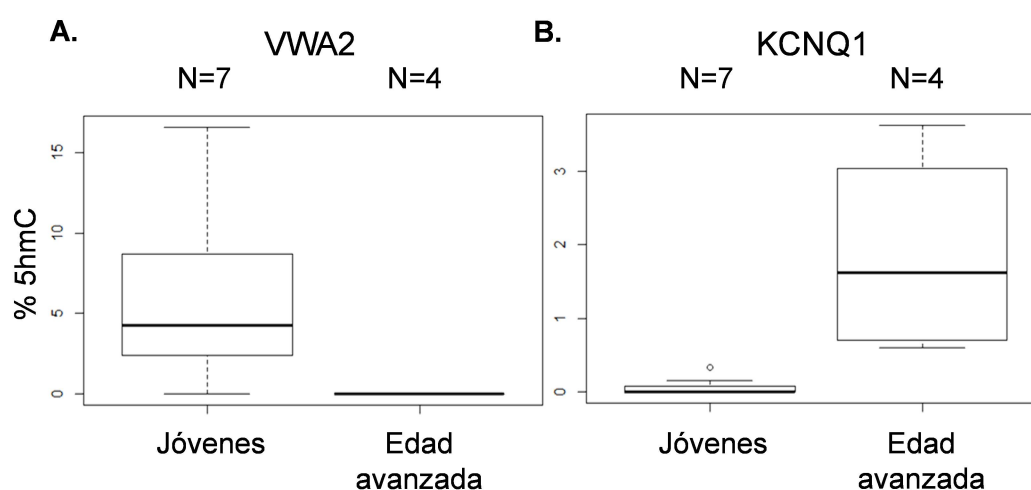


Figura 26. *Boxplots* comparando los valores de la 5hmC obtenidos en muestras de 7 donantes jóvenes y 4 de edad avanzada mediante pirosecuenciación del ADN de dos sitios CpG localizados en los intrones de los genes VWA2 (A.) y KCNQ1 (B.).

4.2.4 Caracterización de las dhmCpGs desde el punto de vista genómico-funcional

Para estudiar las características de las dhmCpGs en MSCs desde el punto de vista genómico y su posible efecto funcional, realizamos un análisis bioestadístico que nos permitiera identificar la localización de estos sitios CpGs en diferentes tipos de islas CpGs, su distancia a centrómeros y telómeros y diferentes regiones génicas (ver métodos).

4.2.4.1 Densidad de CpGs de los sitios dhmCs

El análisis de los datos mostró que los sitios hipo5hmCs se encontraban en zonas con baja densidad de CpGs (test no paramétrico, $p < 0,001$, $D = -0,25$) con respecto a la distribución de las sondas del *array*. En línea con estos resultados, los sitios hiper5hmCs estaban enriquecidos en islas CpG (test chi-cuadrado; $p < 0,001$, $OR = 1,54$) (Figura 27A), mientras que la hipo5hmC estaba mayormente enriquecida fuera de islas CpG comparado con la distribución de las sondas del *array* (test chi-cuadrado; $p < 0,001$, $OR = 2.09$) (Figura 27B).

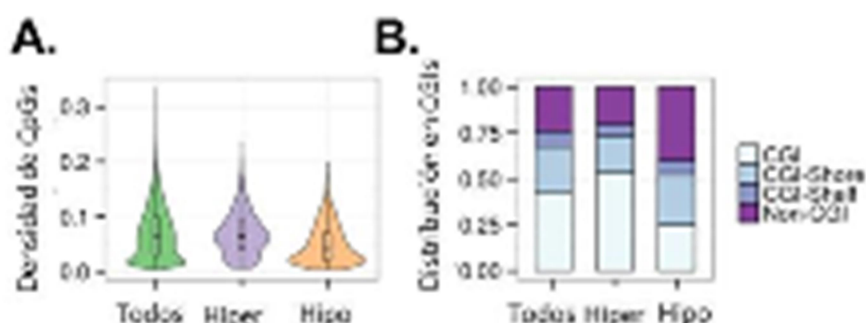


Figura 27. A. Diagramas de violín mostrando la densidad de CpGs de los sitios hiper e hipohidroximetilados con la edad en MSCs (hiper e hipo) en comparación con la densidad de las CpGs analizadas en el *array* (Todos). B. Gráfico de barras en el que se representa la distribución de los sitios que ganan (hiper) y pierden (hipo) hidroximetilación con el tiempo en comparación con la distribución del resto de las CpGs analizadas en el *array* (Todos) según su localización con respecto a islas CpGs: dentro de islas (CGI), CpG shore (CGI Shore), CpG shelf (CGI shelf) y fuera de islas (Non-CGI).

4.2.4.2 Localización cromosómica de los sitios dhmCs

Para determinar la localización cromosómica de los sitios dhmCs, se analizó la distancia a centrómeros y a telómeros de los sitios CpG frecuentemente

hidroximetilados mediante un test no paramétrico de Wilcoxon con respecto a las sondas analizadas en el *array*. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los sitios hipo5hmC y las sondas del *array*. Por el contrario, los sitios hiper5hmC estaban localizados de forma significativa lejos de centrómeros (test no paramétrico de Wilcoxon; $p=0,006$ $D=0,06$) (Figura 32A) y cerca de telómeros (test no paramétrico de Wilcoxon; $p<0,001$ $D=-0,15$), respecto a las CpGs analizadas en el *array* (Figura 28B).

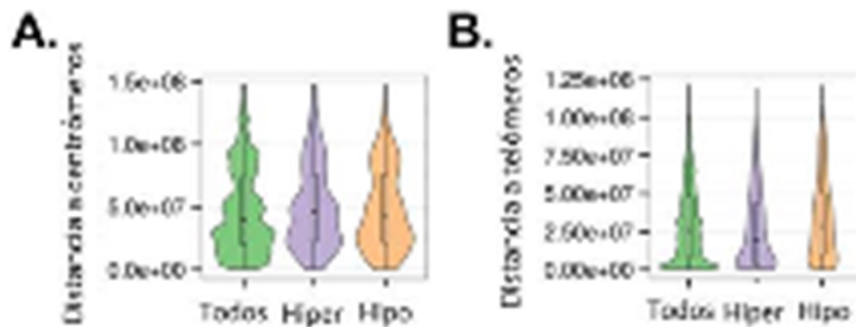


Figura 28. Diagramas de violín mostrando la distancia a centrómeros (A.) y a telómeros (B.) de los sitios hiper e hipohidroximetilados en comparación con las distancias de todas las CpGs analizadas en el *array*.

4.2.4.3 Localización genómica de los sitios dhmCs

Para determinar la localización genómica de los sitios dhmCs, mediante chi-cuadrado se comparó la localización de los sitios dhmCs con la de las sondas del *array* en cada una de estas regiones genómicas (promotores, regiones 5' UTR, primeros exones, exones, intrones, regiones 3' UTR y regiones intergénicas). Los sitios hiper5hmCs se encontraban enriquecidos en intrones (test chi-cuadrado; $p<0,001$, $OR=1,37$), primer exón (test chi-cuadrado; $p<0,001$, $OR=1,36$), exones (test chi-cuadrado; $p<0,001$, $OR=1,78$) y regiones 3'UTR (test chi-cuadrado; $p<0,001$, $OR=1,62$). Ambos, hiper5hmCs e hipo5hmCs, se encontraban enriquecidos en regiones intergénicas (test chi-cuadrado; $p<0,001$, $OR=1,51$ y $p<0,001$, $OR=1,80$, hiper5hmC e hipo5hmC, respectivamente) y empobrecidos en promotores (test chi-cuadrado; $p<0,001$, $OR=0,35$ y $p<0,001$, $OR=0,7$, respectivamente) y 5'UTR (test chi-cuadrado; $p<0,001$, $OR=0,60$ y $p<0,001$, $OR=0,43$, respectivamente). Además, los sitios hipo5hmC estaban también empobrecidos en el primer exón (test chi-cuadrado; $p<0,001$, $OR=0,53$) (Figura 29).

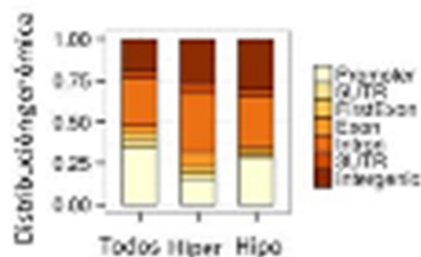


Figura 29. Gráfico de barras de la distribución genómica de los sitios hiper e hipohidroximetilados en comparación con la distribución de todas las CpGs analizadas en el array.

4.2.5 Relación entre los cambios de 5mC y 5hmC

Para determinar la relación existente entre la 5-metilcitosina (5mC) y la 5-hidroximetilcitosina (5hmC) con la edad en MSCs, se identificaron, en primer lugar, los sitios CpG que ganaban o perdían 5-metilcitosina durante el envejecimiento en el mismo set de muestras que el utilizado para el análisis de la 5hmC. Al comparar los niveles de 5mC de jóvenes y personas de edad avanzada, mediante un test no paramétrico de Wilcoxon, se identificaron 13559 sitios CpGs que estaban diferencialmente 5-metilados (d5mCs) ($FDR < 0,05$) en las células MSCs con la edad. De estos sitios d5mCs, 9851 (72,65%) perdían 5mC (hipo5mC), y 3708 (27,35%) ganaban 5mC (hiper5mC) con la edad. Comparando los cambios de 5hmC y los de 5mC con la edad, se observó que gran parte de los sitios CpG hiperhidroximetilados (54,52%) se correspondían con sitios que perdían 5-metilcitosina en individuos de avanzada edad (Figura 30).

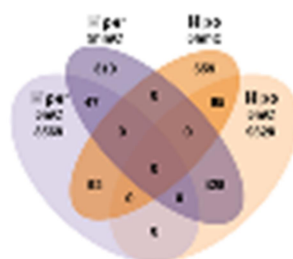


Figura 30. Diagrama de Venn comparando los cambios de 5hmC con los cambios de 5mC durante el envejecimiento en MSCs.

5.2.6 Asociación de los sitios dhmCs con la cromatina

Para identificar posibles asociaciones entre los cambios de 5hmC en el envejecimiento de células madre adultas y las diferentes marcas post-traduccionales de histonas, se compararon los sitios hipo e hiper5hmC con datos previamente publicados de modificaciones de histonas y enzimas implicados en llevar a cabo estas modificaciones, de 10 líneas celulares diferentes (ver métodos). Mediante este análisis se encontró que ambos conjuntos, estaban asociados, preferentemente, (test de Fisher; $p < 0,05$) a la marca activa de histonas H3K4me1 y también a la marca represiva H3K9me3. Los sitios hiper5hmC estaban, además, asociados a la marca represiva H3k27me3, a su metiltransferasa *EZH2* y a la H4k20me1 (Figura 31A y B).

Para estudiar el estado de la cromatina en regiones donde se localizaban los sitios dhmCs, además de los análisis anteriores, se utilizó una base de datos basada en las diferentes segmentaciones de la cromatina generadas con un modelo de Markov (HMM) de resultados de *ChIP-seq* del proyecto del código de histonas ENCODE, las cuales se relacionaron y etiquetaron de acuerdo con su estado funcional (Ernst and Kellis 2010, Ernst, Kheradpour et al. 2011). Al comparar los sitios dhmCs con los distintos estados de la cromatina, observamos que, tanto la ganancia como la pérdida de hidroximetilación, estaban asociadas a *enhancers* (test de Fisher; $p < 0,05$). Además los sitios hiper5hmC estaban también asociados a regiones represoras, las cuales están relacionadas con las marcas de histonas H3K9me3 y H3k27me3 (Jason Ernst, 2010) (Figura 31C).

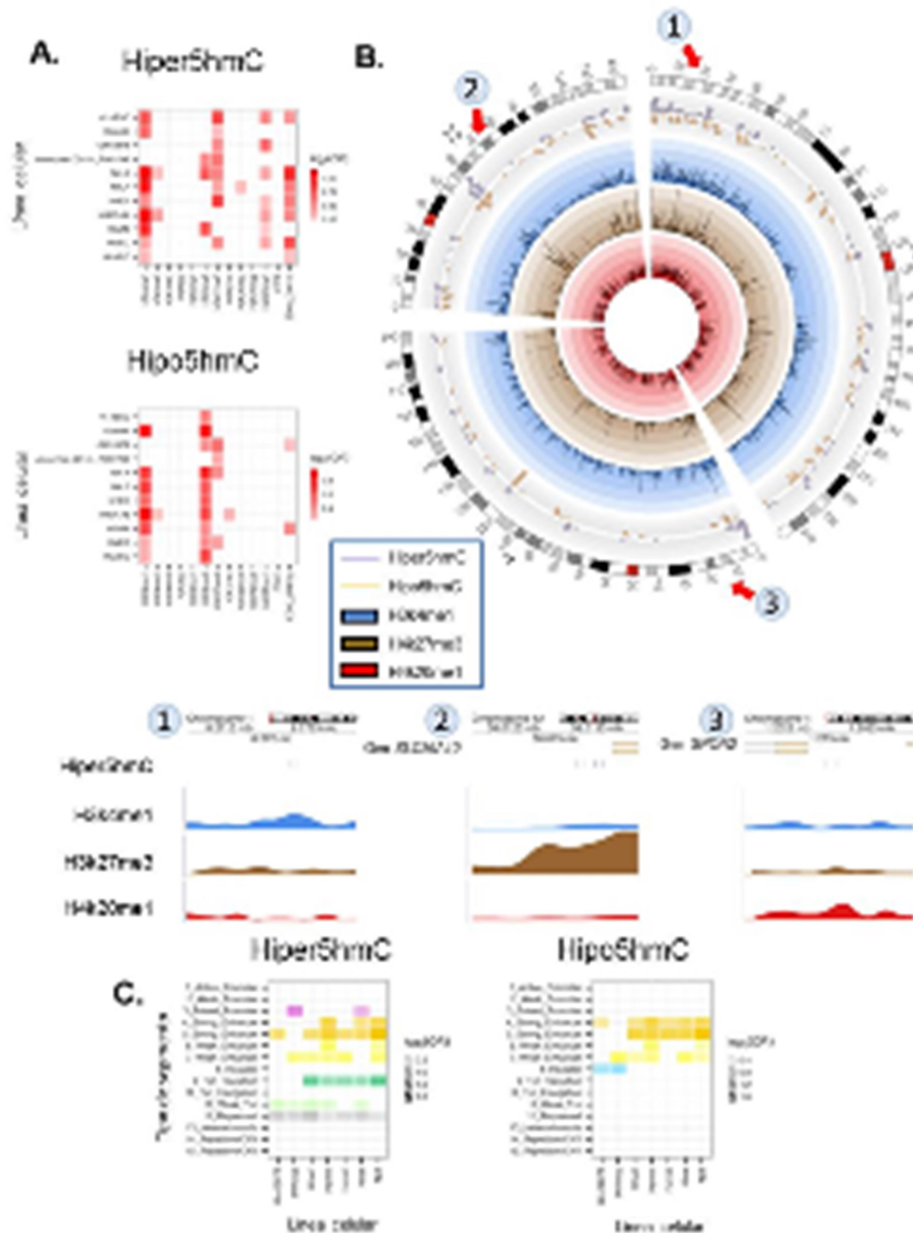


Figura 35. Asociación entre cromatina y los cambios de hidroximetilación del ADN durante el envejecimiento en MSCs. A. *Heatmaps* en los que se muestra el enriquecimiento de las diferentes marcas de histonas del UCSC Genome Browser Broad Histone track del proyecto ENCODE de los sitios CpG hiper e hipo5hmC de MSCs. El código de color representa el enriquecimiento basándose en el logaritmo en base 2 del odds ratio. B. Representación circular de tres cromosomas (1, 4 y 12), indicando los sitios CpG que se hiperhidroximetilan (azul) e hipohidroximetilan (amarillo) en MSCs. Las tracks interiores representan diferentes marcas de cromatina (H3K4me1, H3K27me3 y H4k20me1). En la parte inferior se muestran 3 ejemplos representativos de regiones de 200 kpb en las que se ve asociación entre hiperhidroximetilación y marcas histonas. C. *Heatmaps* en los que se muestra el enriquecimiento relativo de los sitios hiper e hipo5hmC en las diferentes segmentaciones de la cromatina generadas con un modelo de *Markov* (HMM) de resultados de *ChIP*-seq del proyecto del código de histonas ENCODE. El código de color representa el enriquecimiento basándose en el logaritmo en base 2 del *odds ratio*.

5. Discusión

El envejecimiento se caracteriza por un declive progresivo de las funciones celulares y, en su regulación, están implicados numerosos mecanismos moleculares, entre los que se incluyen las alteraciones epigenéticas, como la metilación del ADN y las modificaciones post-traduccionales de las histonas (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013). Esta pérdida de función tiene lugar en todos los tipos celulares que conforman un ser vivo, incluidas las células madre adultas, las cuales se localizan en nichos distribuidos por todo el organismo y son las encargadas de mantener la homeostasis tisular y regenerar los tejidos en respuesta al daño. Según la teoría del envejecimiento de las células madre adultas (Signer and Morrison 2013), la acumulación de errores y alteraciones que tienen lugar en este tipo de células jugarían un papel crucial en el proceso de envejecimiento. Cambios en estas podrían conducir a una reducción en número y a una pérdida de multipotencialidad, perdiendo progresivamente su capacidad de respuesta al daño y de reparación tisular, dando como resultado un mal funcionamiento de los tejidos.

En un organismo adulto existen diferentes tipos de células madre adultas. Algunos de estos tipos, como las células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales son más fáciles de aislar para su estudio. En estas últimas, además, se ha descrito que tienen propiedades inmunosupresoras que las hacen buenas candidatas para su uso en terapia celular al modular la inflamación y reprimir las respuestas inmunes en enfermedades como esclerosis múltiple, diabetes autoinmune y artritis reumatoide (Glenn and Whartenby 2014).

El objetivo principal de esta tesis ha sido describir los cambios de metilación del ADN (metilcitosina e hidroximetilcitosina) que tienen lugar durante el envejecimiento en células madre mesenquimales. Estudios anteriores han propuesto que ambas marcas epigenéticas pueden jugar un papel importante en la regulación de la expresión génica (Fraga and Esteller 2007, Stroud, Feng et al. 2011). Por tanto, las alteraciones que puedan sufrir estas marcas epigenéticas durante la vida de los individuos en las células madre adultas podrían contribuir al proceso natural del envejecimiento de manera clave. Para llevar a cabo los objetivos propuestos en esta tesis, se utilizó la plataforma de análisis *HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina®) para determinar los niveles de metilación e hidroximetilación de unos 480.000 sitios

CpG repartidos por todo el genoma en células madre mesenquimales de donantes de diferentes edades (2 a 91 años).

Existen numerosos estudios previos en los que se describen cambios de metilación del ADN que tienen lugar a lo largo del tiempo, en diferentes tejidos, como en células sanguíneas (Heyn, Li et al. 2012, Johansson, Enroth et al. 2013) o cortex prefrontal (Numata, Ye et al. 2012), en los que se ha observado un descenso global de metilación del ADN y una hipermetilación específica de promotores. Como se ha comentado en la introducción, esta pérdida de metilación global con el paso del tiempo, fue la primera asociación descrita entre epigenética y envejecimiento en el ADN de salmón (Berdyshev, Korotaev et al. 1967) y, posteriormente, confirmada en otros organismos (Wilson, Smith et al. 1987). Aunque estos estudios apuntarían a que la hipometilación del ADN podría ser un mecanismo común del envejecimiento, se ha visto que en algunos tejidos, como el músculo esquelético, parece tener lugar un aumento de metilación del ADN con el paso del tiempo (Zykovich, Hubbard et al. 2014). En nuestro estudio de metilación de MSCs, en el que se analizaron 34 muestras pertenecientes a dos grupos de edad diferentes, jóvenes de 2 a 22 años y personas de edad avanzada de 61 a 91 años, el número de sondas hipometiladas casi triplicaba al de las que hipermetilaban con el paso del tiempo (45407 frente a 18735 sitios CpG), lo que indica, en línea con lo que se ha visto en otros tejidos, que el envejecimiento de las MSCs podría estar asociado con una hipometilación global del ADN. Este evento, además, ha sido relacionado con diferentes enfermedades cuya predisposición aumenta con el envejecimiento, como el cáncer (Feinberg and Vogelstein 1983) o el alzhéimer (West, Lee et al. 1995, Fuso, Nicolia et al. 2011). Sin embargo, el hecho de que el número de sondas que pierde metilación sea superior al número que gana, no implica la existencia de una hipometilación global, ya que el análisis mediante la plataforma *HumanMethylation450 BeadChip* sólo cubre una parte del genoma. Las regiones del genoma cuyos niveles de metilación del ADN pueden asemejarse a los niveles de metilación globales son las regiones repetitivas, como *LINE-1* y *Alu* (Weisenberger, Campan et al. 2005) y la plataforma *HumanMethylation450 BeadChip* cubre menos del 5% de estas regiones (Clark Palta Joyce 2012). Estudios posteriores con mayor número de muestras y un análisis de metilación en estas regiones

repetitivas serán necesarios para determinar la existencia de una hipometilación global del ADN con la edad en MSCs.

De los sitios CpG diferencialmente metilados con la edad en MSCs, 80 sitios CpG han sido previamente identificados en otros tejidos, como sangre y cerebro, lo que sugiere la existencia de una serie de cambios de metilación asociados a la edad que son independientes del tipo de tejido (Rakyan, Down et al. 2010, Heyn, Li et al. 2012). Sin embargo, aunque identificamos cambios comunes a diferentes tejidos, estos son minoritarios, lo que sugiere que estos estarían restringidos a un escaso número de regiones genómicas específicas. El hecho de que la mayor parte de los cambios no sean comunes entre los diferentes tejidos apoya la posibilidad de que el tipo celular juegue un papel importante en la determinación de los cambios de metilación del ADN a lo largo del tiempo (Christensen, Houseman et al. 2009, Day, Waite et al. 2013).

De forma interesante, el perfil genómico-funcional de ambos grupos de CpGs que cambia durante el envejecimiento (Hiper e hipomC) es muy similar; ambos se localizan en regiones con baja densidad de CpGs, fuera de islas, alejados de centrómeros y cerca de telómeros, y en regiones intergénicas e intrones. Esto podría sugerir que las ganancias y pérdidas de metilación tienen lugar en el mismo tipo de regiones dentro del genoma en las MSCs, existiendo, así, zonas dinámicas y zonas que no varía su metilación.

Debido a que la metilación del ADN no se trate de un mecanismo epigenético aislado, sino que funciona de manera coordinada con el resto de mecanismos, ha tenido como consecuencia que la relación entre cambios en esta y la cromatina durante el envejecimiento haya sido muy estudiada en los últimos años. Recientemente, se ha visto que genes que se hipermetilan durante el envejecimiento en células sanguíneas están asociados con la presencia de dominios bivalentes en células madre embrionarias (Rakyan, Down et al. 2010, Teschendorff, Menon et al. 2010, Fernandez, Assenov et al. 2012, Heyn, Li et al. 2012) y con marcas de represión (H3K27me3/H3K9me3) en células diferenciadas (Rakyan, Down et al. 2010). Por ello, en esta tesis nos propusimos estudiar la relación entre las diferentes marcas de histonas y los sitios CpG que se hipermetilaban con la edad en células madre adultas. En los resultados del análisis de comparación entre los cambios metilación y la

cromatina en MSCs, se ha visto que las mismas marcas de histonas represivas asociadas previamente con la hipermetilación del ADN en células sanguíneas (H3k27me3 y H3k9me3), también se encontraban asociadas a las regiones hipermetiladas con la edad en MSCs y, además, esta asociación también ocurría en glía, cerebro y los sitios CpG comunes a todos los tejidos. Los resultados indican que hay asociación entre estas marcas y la ganancia de metilación, independientemente del potencial morfogénico y tipo celular, lo que podría sugerir que, por mecanismos moleculares que desconocemos, las marcas represoras de la cromatina favorecen la acumulación de metilación del ADN con el tiempo.

En relación a la pérdida de metilación durante el envejecimiento de MSCs, los análisis mostraron una fuerte asociación entre la hipometilación del ADN y la marca de activación de histonas H3k4me1, y esta misma asociación sucede en otros tipos celulares como glía, cerebro, células sanguíneas y sitios CpG comunes que pierden metilación en estos tipos celulares. Estos resultados sugieren que la marca de activación H3K4me1 está fuertemente asociada a la pérdida de metilación del ADN con la edad independientemente del tipo celular. Recientemente, esta marca se ha visto asociada con *enhancers*, que son regiones cortas de ADN implicadas en la regulación de la expresión génica y que no tienen por qué localizarse próximos al gen que regulan. Pueden encontrarse en dos estados diferentes: estado “activo”, asociado a las marcas de histonas H3K4me1 y la acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27ac), y estado “preparado”, asociado sólo a la H3K4me1 (Creyghton, Cheng et al. 2010). El hecho de que un estudio previo ha relacionado la hipometilación del ADN en transposones que están asociados a *enhancers* específicos de tejido (Xie, Hong et al. 2013), podría sugerir que la H3K4me1, junto con la hipometilación del ADN, podría estar implicada en la derregulación de la expresión génica que tiene lugar durante el envejecimiento (Bahar, Hartmann et al. 2006), activándose genes implicados en la diferenciación celular.

A pesar de que el número de sitios CpGs comunes que se hiper- e hipometilan en los diferentes tejidos durante el envejecimiento es muy pequeño, las marcas de histonas, asociadas tanto a la ganancia como a la pérdida de metilación del ADN, son similares en los diferentes tejidos. Esto apoyaría la hipótesis de que los cambios de metilación durante el envejecimiento están de alguna manera coordinados con las

diferentes marcas post-traduccionales de las histonas. Sin embargo, las razones por las cuales las marcas represivas de histonas, como la H3K27me3 y la H3K9me3, facilitan la hipermetilación y, por el contrario, la marca de activación H3K4me1 facilita la hipometilación, están aún por determinar. Una posible explicación de este fenómeno podría ser el hecho de que la metiltransferasa DNMT1 se une preferentemente a regiones de heterocromatina (Jeong, Liang et al. 2009) y, por tanto, a las regiones asociadas a marcas de represión las cuales mantendrían con mayor facilidad sus niveles de metilación, mientras que, por el contrario, las zonas asociadas a marcas de activación perderían con más facilidad metilación durante la división celular.

Hasta hace pocos años, el papel y los cambios de metilación descritos en los diferentes procesos vitales, diferentes tejidos y tipos celulares, como la diferenciación, el desarrollo embrionario, el crecimiento y la aparición de enfermedades, fueron atribuidos a la 5-metilcitosina. Sin embargo, el reciente descubrimiento de la 5hmC (Kriaucionis and Heintz 2009, Tahiliani, Koh et al. 2009) y el hecho de que ahora se conoce que una parte de la metilación descrita, mayor o menor dependiendo del tipo de tejido, corresponda, por tanto, a la 5hmC, ya que ambas marcas epigenéticas son resistentes a la modificación por bisulfito sódico, hace que sea importante tenerla en cuenta para futuros estudios de metilación del ADN. Por ello, en esta tesis, tras identificar los cambios de metilación en MSCs que tienen lugar durante el envejecimiento, nos propusimos estudiar la implicación de la 5hmC en el envejecimiento de MSCs y su relación con la 5mC.

Mientras que la distribución de la 5mC ha sido ampliamente descrita en la literatura, la distribución de la 5hmC es actualmente menos conocida. Por tanto, como paso previo a describir los cambios durante el envejecimiento, estudiamos su distribución genómica de la 5hmC en las MSCs. Para llevar a cabo la descripción del perfil genómico de la 5hmC, identificamos un conjunto de sondas eligiendo aquellos sitios CpG cuya diferencia en beta fuera superior a 0.1 y estuviera presente en más de la mitad de las muestras, obteniendo, así, miles de sitios CpG frecuentemente hidroximetilados (FhmC) en MSCs, los cuales comparamos con todos los sitios CpG analizados en el *array*. Mediante esta estrategia identificamos los sitios frecuentemente hidroximetilados y, posteriormente, caracterizamos su distribución

genómica con respecto a la densidad de CpGs, secuencias determinadas del genoma, su distribución con respecto a los genes y las diferentes marcas cromatínicas.

En cuanto a la localización de la 5hmC con respecto a la distribución de sitios CpG dentro del genoma, el análisis determinó que la 5hmC se encuentra generalmente localizada en regiones de baja densidad de CpGs y, por tanto, fuera de islas CpG, en línea con otros trabajos anteriores de células madre embrionarias en mamíferos (Yu, Hon et al. 2012, Sun, Terragni et al. 2013).

Uno de los papeles ampliamente atribuidos a la 5hmC en la literatura es su posible implicación en la regulación de *enhancers* (Stroud, Feng et al. 2011, Yu, Hon et al. 2012, Sun, Terragni et al. 2013, Tsagaratou, Aijo et al. 2014, Wen, Li et al. 2014, Feng, Shao et al. 2015). Nuestros resultados obtenidos del *array* apoyaron esta asociación entre los sitios FhmC y los *enhancers*. Además, el hecho de que los sitios FhmC estén asociados con la marca de histonas H3k4me1, pero no con la marca H3k27ac, podría indicar que la 5hmC estaría preferentemente asociada a *enhancers* en estado “preparado” y no a *enhancers* activos. En los estudios previos sobre la asociación entre FhmC y *enhancers* existe controversia en cuanto al tipo de *enhancer* al que estaría asociada la 5hmC. En línea con nuestros análisis, algunos trabajos describen una relación entre la 5hmC y *enhancers* en estado “preparado” en células madre embrionarias (Sun, Terragni et al. 2013) y diferenciadas (Wen, Li et al. 2014). Sin embargo, otros han descrito una asociación con *enhancers* en estado activo en células madre embrionarias y células T (Stroud, Feng et al. 2011, Tsagaratou, Aijo et al. 2014).

Además de en regiones implicadas en la regulación de la transcripción, la 5hmC también se ha visto asociada al cuerpo de los genes tanto en ESCs (Wu and Zhang 2011), como en células diferenciadas (Szulwach, Li et al. 2011, Feng, Shao et al. 2015). En línea con estos trabajos, en nuestro estudio en MSCs, también se ha visto un enriquecimiento de 5hmC en el cuerpo de los genes, en concreto en intrones. La posible función de esta asociación está aún por esclarecer, aunque estudios previos parecen relacionarla con un aumento de la expresión génica (Szulwach, Li et al. 2011, Wu and Zhang 2011), *splicing* alternativo (Feng, Shao et al. 2015) y con la pérdida de metilcitosina en esas regiones (Mellen, Ayata et al. 2012).

Como ya se ha comentado en la introducción, existen numerosos estudios que atribuyen a la 5hmC un papel en el proceso de demetilación del ADN, tanto de manera activa como pasiva. En nuestro estudio, el hecho de que existan similitudes entre el perfil genómico de la 5hmC y el perfil de la hipometilación del ADN con la edad, estaría en línea con la hipótesis de los estudio anteriores en los que se ha descrito una ganancia de 5hmC en regiones donde se perdía 5mC en células diferenciadas (Szulwach, Li et al. 2011, Wen, Li et al. 2014). Ambos conjuntos de sitios CpG se encuentran enriquecidos fuera de islas CpG, en regiones intergénicas, intrones y asociados con la marca de histonas H3k4me1. Además, se ha visto una asociación entre el aumento de 5hmC y la pérdida de 5-metilcitosina durante el envejecimiento en MSCs, lo que podría, nuevamente, apoyar la existencia de un papel de la 5hmC como intermediario en la pérdida pasiva de metilación del ADN durante el envejecimiento de MSCs (Figura 36).

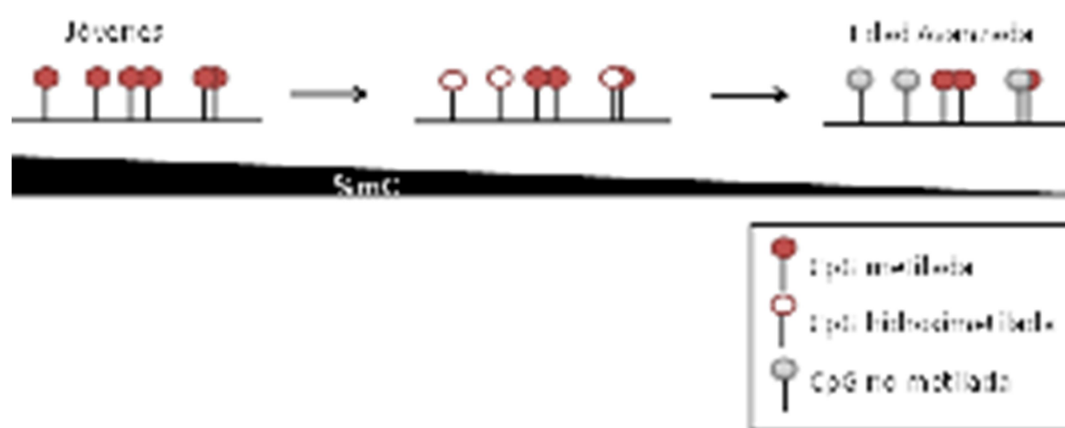


Figura 36. Representación esquemática de función de la 5hmC como intermediario en la pérdida pasiva de metilación del ADN durante el envejecimiento

A pesar de que todas las líneas celulares fueron cultivadas en las mismas condiciones, la purificación y el cultivo *in vitro* de las MSCs podría ser una posible limitación de este trabajo (Choi, In et al. 2012, Nestor, Ottaviano et al. 2012, Nestor, Ottaviano et al. 2015). En un estudio previo se ha descrito que el cultivo prolongado *in vitro* de células madre mesenquimales da lugar a un incremento de la metilación en genes relacionados con la replicación del ADN (Choi, In et al. 2012). En nuestro caso, los experimentos fueron realizados con células mesenquimales en pases más

tempranos (4-6), por lo que los cambios de metilación no tendrían un gran impacto en nuestros resultados. En cuanto al estudio de la 5hmC en cultivo *in vitro*, recientemente se ha descrito que la adaptación de las células al cultivo celular tiene como consecuencia una considerable pérdida de 5hmC (Nestor, Ottaviano et al. 2015), por lo que los niveles descritos en este trabajo podrían corresponder sólo a una parte de la 5hmC que existe *in vivo*. Sin embargo, el hecho de que el perfil de la 5hmC descrito en este estudio sea bastante homogéneo en ambos grupos de edad y la existencia de un número elevado de sitios CpG frecuentemente hidroximetilados, parece indicar que no se trata sólo de una modificación transitoria, sino que se mantiene durante la división celular, como se apunta en otro estudio reciente, en el que se describe a la 5hmC como una marca estable durante la división celular, aunque su síntesis es más lenta que la 5-metilcitosina (Bachman, Uribe-Lewis et al. 2014).

Ambos experimentos de *HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina[®]) han sido validados mediante la técnica de pirosecuenciación de bisulfito. En el caso de la metilcitosina, se validaron 5 de los genes identificados en los *arrays* de metilación (*HAND2*, *SIX2*, *TBX15*, *PITX2* y *HOXA11*), en un conjunto independiente de 46 MSCs obtenidas de donantes de entre 7 meses y 80 años. Los resultados corroboraron los datos extraídos de los *arrays* de metilación, hecho que, además de validar el estudio, sugiere que puede ser extrapolado a otros estudios de MSCs, obtenidas y cultivadas de manera independiente. Los genes hipermetilados, *HAND2* y *SIX2*, son factores de transcripción y, además, se ha visto que se encuentran hipermetilados en diferentes tipos de cáncer (Rauch, Li et al. 2006, Tong, Wierda et al. 2010, Jones, Teschendorff et al. 2013). Por el contrario, los genes validados que pierden metilación durante el envejecimiento, *TBX15*, *PITX2* y *HOXA11*, son factores de transcripción implicados en procesos de diferenciación y desarrollo (Singh, Petry et al. 2005, Gross, Krause et al. 2012, Gage, Kuang et al. 2014). Esto podría sugerir que las células madre mesenquimales durante el envejecimiento adquieren por un lado una mayor susceptibilidad al cáncer y, por otro lado, perderían totipotencialidad al activarse genes de diferenciación celular (Figura 37).

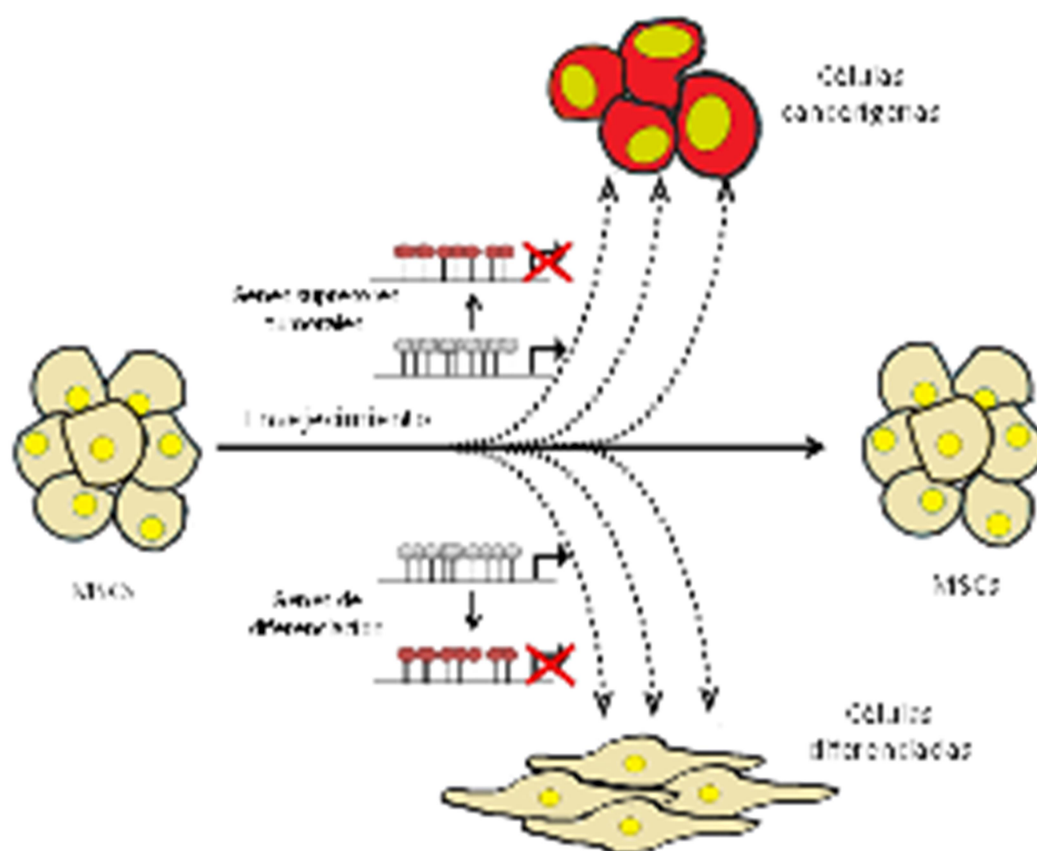


Figura 37. Representación esquemática de los cambios de metilación que se dan durante el envejecimiento. Por una parte (representado en la parte superior), genes frecuentemente hipermetilados en cáncer ganarían metilación durante el envejecimiento, aumentando así la predisposición al desarrollo tumoral. Por otra parte (representado en la parte inferior), genes relacionados con la diferenciación celular perderían metilación pudiendo aumentar así su expresión y como consecuencia las células perderían parte de su pluripotencialidad.

Con respecto al análisis de 5-hidroximetilcitosina, a pesar de las limitaciones del estudio y del hecho de que la herramienta *HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina®) haya sido poco utilizada en estudios previos y, en todo caso, para el análisis de tejidos con unos niveles mayores de 5hmC que los niveles medios de MSCs, la técnica fue validada mediante un método puesto a punto en el laboratorio. Este método permite el análisis de la 5hmC mediante la pirosecuenciación del ADN en regiones específicas. Para ello, elegimos dos secuencias genómicas alrededor de dos sitios CpGs con cambios significativos de 5hmC durante el envejecimiento, localizados

en intrones de los genes *VWA2* y *KCNQ1*, en la que validamos este descenso y aumento de 5hmC con la edad. Por tanto, en esta tesis, además de desarrollar una metodología para validar los resultados obtenidos en el *array*, la puesta a punto de este nuevo método permitirá el estudio de los patrones de 5hmC de una forma región-específica.

El análisis de la 5hmC mediante la técnica de pirosecuenciación de bisulfito de genes candidatos relacionados con diferentes procesos fisiológicos y patológicos de manera sencilla y a bajo coste, ayudará a esclarecer en estudios futuros el papel funcional de la 5hmC en el ADN y su implicación en los diferentes procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades, como el cáncer.

6. Conclusiones

A continuación, se enumeran las conclusiones más relevantes obtenidas en esta Tesis Doctoral:

1. Aunque los resultados de los *arrays* de metilación muestren un mayor número de sitios CpG que pierden metilación durante el envejecimiento en células madre mesenquimales, esto no es suficiente para determinar la existencia de una hipometilación global.
2. La mayor parte de los cambios de metilación que tienen lugar durante el envejecimiento son dependientes del tipo celular.
3. La pérdida de metilación durante el envejecimiento está asociada a la marca de histonas H3K4me1 en MSCs, células sanguíneas, neuronas y glía.
4. La 5hmC está enriquecida en MSCs en regiones con baja densidad de CpGs, regiones intergénicas e intrones y en *enhancers* asociados con la marca de histonas H3K4me1, y estas características parecen ser independientes del estado de pluripotencia celular.
5. No se aprecian cambios globales sustanciales de 5hmC durante el envejecimiento de las MSCs.
6. El perfil genómico de la 5hmC presenta similitudes con la hipometilación del ADN durante el envejecimiento y, además, su ganancia está asociada a la pérdida de metilación del ADN durante este en MSCs.
7. Se ha puesto a punto el análisis de 5hmC a nivel genómico-específico mediante la técnica de pirosecuenciación de bisulfito.

7. Bibliografía

Agrawal, A., J. Tay, G. E. Yang, S. Agrawal and S. Gupta (2010). "Age-associated epigenetic modifications in human DNA increase its immunogenicity." Aging (Albany NY) **2**(2): 93-100.

Agrelo, R., W. H. Cheng, F. Setien, S. Roper, J. Espada, M. F. Fraga, M. Herranz, M. F. Paz, M. Sanchez-Céspedes, M. J. Artiga, D. Guerrero, A. Castells, C. von Kobbe, V. A. Bohr and M. Esteller (2006). "Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(23): 8822-8827.

Aguilera, O., A. F. Fernandez, A. Munoz and M. F. Fraga (2010). "Epigenetics and environment: a complex relationship." J Appl Physiol (1985) **109**(1): 243-251.

Alisch, R. S., B. G. Barwick, P. Chopra, L. K. Myrick, G. A. Satten, K. N. Conneely and S. T. Warren (2012). "Age-associated DNA methylation in pediatric populations." Genome Res **22**(4): 623-632.

Anderson, O. S., M. S. Nahar, C. Faulk, T. R. Jones, C. Liao, K. Kannan, C. Weinhouse, L. S. Rozek and D. C. Dolinoy (2012). "Epigenetic responses following maternal dietary exposure to physiologically relevant levels of bisphenol A." Environ Mol Mutagen **53**(5): 334-342.

Aryee, M. J., A. E. Jaffe, H. Corrada-Bravo, C. Ladd-Acosta, A. P. Feinberg, K. D. Hansen and R. A. Irizarry (2014). "Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays." Bioinformatics **30**(10): 1363-1369.

Austad, S. N. (1989). "Life extension by dietary restriction in the bowl and doily spider, *Frontinella pyramitela*." Exp Gerontol **24**(1): 83-92.

Baccarelli, A. and V. Bollati (2009). "Epigenetics and environmental chemicals." Curr Opin Pediatr **21**(2): 243-251.

Baccarelli, A., M. Rienstra and E. J. Benjamin (2010). "Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies." Circ Cardiovasc Genet **3**(6): 567-573.

Bachman, M., S. Uribe-Lewis, X. Yang, M. Williams, A. Murrell and S. Balasubramanian (2014). "5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification." Nat Chem **6**(12): 1049-1055.

Bae, K. S., J. B. Park, H. S. Kim, D. S. Kim, D. J. Park and S. J. Kang (2011). "Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Yonsei Med J **52**(3): 401-412.

Bahar, R., C. H. Hartmann, K. A. Rodriguez, A. D. Denny, R. A. Busuttil, M. E. Dolle, R. B. Calder, G. B. Chisholm, B. H. Pollock, C. A. Klein and J. Vijg (2006). "Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart." Nature **441**(7096): 1011-1014.

Ballestar, E. and M. Esteller (2005). "Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger." Biochem Cell Biol **83**(3): 374-384.

Barres, R., M. E. Osler, J. Yan, A. Rune, T. Fritz, K. Caidahl, A. Krook and J. R. Zierath (2009). "Non-CpG methylation of the PGC-1alpha promoter through DNMT3B controls mitochondrial density." Cell Metab **10**(3): 189-198.

Baylin, S. B. (2005). "DNA methylation and gene silencing in cancer." Nat Clin Pract Oncol **2 Suppl 1**: S4-11.

Baylin, S. B. and J. E. Ohm (2006). "Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?" Nat Rev Cancer **6**(2): 107-116.

Baymaz, H. I., A. Fournier, S. Laget, Z. Ji, P. W. Jansen, A. H. Smits, L. Ferry, A. Mensinga, I. Poser, A. Sharrocks, P. A. Defossez and M. Vermeulen (2014). "MBD5 and MBD6 interact with the human PR-DUB complex through their methyl-CpG-binding domain." Proteomics **14**(19): 2179-2189.

Berdasco, M. and M. Esteller (2012). "Hot topics in epigenetic mechanisms of aging: 2011." Aging Cell **11**(2): 181-186.

Berdyshev, G. D., G. K. Korotaev, G. V. Boiarskikh and B. F. Vaniushin (1967). "[Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback and its changes during spawning]." Biokhimiia **32**(5): 988-993.

Berger, S. L., T. Kouzarides, R. Shiekhattar and A. Shilatifard (2009). "An operational definition of epigenetics." Genes Dev **23**(7): 781-783.

Bernstein, B. E., A. Meissner and E. S. Lander (2007). "The mammalian epigenome." Cell **128**(4): 669-681.

Bernstein, B. E., T. S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D. J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S. L. Schreiber and E. S.

Lander (2006). "A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells." Cell **125**(2): 315-326.

Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.

Bird, A. (2008). "The methyl-CpG-binding protein MeCP2 and neurological disease." Biochem Soc Trans **36**(Pt 4): 575-583.

Bird, A. P. (1986). "CpG-rich islands and the function of DNA methylation." Nature **321**(6067): 209-213.

Bjornsson, H. T., H. Cui, D. Gius, M. D. Fallin and A. P. Feinberg (2004). "The new field of epigenomics: implications for cancer and other common disease research." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **69**: 447-456.

Blaschke, K., K. T. Ebata, M. M. Karimi, J. A. Zepeda-Martinez, P. Goyal, S. Mahapatra, A. Tam, D. J. Laird, M. Hirst, A. Rao, M. C. Lorincz and M. Ramalho-Santos (2013). "Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells." Nature **500**(7461): 222-226.

Bocker, M. T., I. Hellwig, A. Breiling, V. Eckstein, A. D. Ho and F. Lyko (2011). "Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging." Blood **117**(19): e182-189.

Booth, M. J., M. R. Branco, G. Ficz, D. Oxley, F. Krueger, W. Reik and S. Balasubramanian (2012). "Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution." Science **336**(6083): 934-937.

Booth, M. J., T. W. Ost, D. Beraldi, N. M. Bell, M. R. Branco, W. Reik and S. Balasubramanian (2013). "Oxidative bisulfite sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine." Nat Protoc **8**(10): 1841-1851.

Bork, S., S. Pfister, H. Witt, P. Horn, B. Korn, A. D. Ho and W. Wagner (2010). "DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells." Aging Cell **9**(1): 54-63.

Bracken, A. P., D. Kleine-Kohlbrecher, N. Dietrich, D. Pasini, G. Gargiulo, C. Beekman, K. Theilgaard-Monch, S. Minucci, B. T. Porse, J. C. Marine, K. H. Hansen and K. Helin (2007). "The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells." Genes Dev **21**(5): 525-530.

Brait, M., J. G. Ford, S. Papaiahgari, M. A. Garza, J. I. Lee, M. Loyo, L. Maldonado, S. Begum, L. McCaffrey, M. Howerton, D. Sidransky, M. R. Emerson, S. Ahmed, C. D. Williams and M. O. Hoque (2009). "Association between lifestyle factors and CpG island methylation in a cancer-free population." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(11): 2984-2991.

Brooks, W. H., C. Le Dantec, J. O. Pers, P. Youinou and Y. Renaudineau (2010). "Epigenetics and autoimmunity." J Autoimmun **34**(3): J207-219.

Campagnoli, C., I. A. Roberts, S. Kumar, P. R. Bennett, I. Bellantuono and N. M. Fisk (2001). "Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow." Blood **98**(8): 2396-2402.

Casillas, M. A., Jr., N. Lopatina, L. G. Andrews and T. O. Tollefsbol (2003). "Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts." Mol Cell Biochem **252**(1-2): 33-43.

Colman, R. J., R. M. Anderson, S. C. Johnson, E. K. Kastman, K. J. Kosmatka, T. M. Beasley, D. B. Allison, C. Cruzen, H. A. Simmons, J. W. Kemnitz and R. Weindruch (2009). "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys." Science **325**(5937): 201-204.

Creyghton, M. P., A. W. Cheng, G. G. Welstead, T. Kooistra, B. W. Carey, E. J. Steine, J. Hanna, M. A. Lodato, G. M. Frampton, P. A. Sharp, L. A. Boyer, R. A. Young and R. Jaenisch (2010). "Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21931-21936.

Chambers, S. M., C. A. Shaw, C. Gatz, C. J. Fisk, L. A. Donehower and M. A. Goodell (2007). "Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation." PLoS Biol **5**(8): e201.

Chapman, T. and L. Partridge (1996). "Female fitness in *Drosophila melanogaster*: an interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males." Proc Biol Sci **263**(1371): 755-759.

Chen, J. H., C. Y. Yip, E. D. Sone and C. A. Simmons (2009). "Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential." Am J Pathol **174**(3): 1109-1119.

Chen, Z. X. and A. D. Riggs (2011). "DNA methylation and demethylation in mammals." J Biol Chem **286**(21): 18347-18353.

Cheng, X. and R. M. Blumenthal (2008). "Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective." Structure **16**(3): 341-350.

Cheng, Y. Y., M. B. Kirschner, N. C. Cheng, S. Gattani, S. Klebe, J. J. Edelman, M. P. Vallely, B. C. McCaughan, H. C. Jin, N. van Zandwijk and G. Reid (2013). "ZIC1 is silenced and has tumor suppressor function in malignant pleural mesothelioma." J Thorac Oncol **8**(10): 1317-1328.

Cheung, T. H. and T. A. Rando (2013). "Molecular regulation of stem cell quiescence." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(6): 329-340.

Choi, M. R., Y. H. In, J. Park, T. Park, K. H. Jung, J. C. Chai, M. K. Chung, Y. S. Lee and Y. G. Chai (2012). "Genome-scale DNA methylation pattern profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells in long-term culture." Exp Mol Med **44**(8): 503-512.

Chouliaras, L., D. L. van den Hove, G. Kenis, J. Dela Cruz, M. A. Lemmens, J. van Os, H. W. Steinbusch, C. Schmitz and B. P. Rutten (2011). "Caloric restriction attenuates age-related changes of DNA methyltransferase 3a in mouse hippocampus." Brain Behav Immun **25**(4): 616-623.

Chowdhury, B., A. McGovern, Y. Cui, S. R. Choudhury, I. H. Cho, B. Cooper, T. Chevassut, A. C. Lossie and J. Irudayaraj (2015). "The hypomethylating agent Decitabine causes a paradoxical increase in 5-hydroxymethylcytosine in human leukemia cells." Sci Rep **5**: 9281.

Christ, B. and P. Stock (2012). "Mesenchymal stem cell-derived hepatocytes for functional liver replacement." Front Immunol **3**: 168.

Christensen, B. C., J. J. Godleski, C. J. Marsit, E. A. Houseman, C. Y. Lopez-Fagundo, J. L. Longacker, R. Bueno, D. J. Sugarbaker, H. H. Nelson and K. T. Kelsey (2008). "Asbestos exposure predicts cell cycle control gene promoter methylation in pleural mesothelioma." Carcinogenesis **29**(8): 1555-1559.

Christensen, B. C., E. A. Houseman, C. J. Marsit, S. Zheng, M. R. Wrensch, J. L. Wiemels, H. H. Nelson, M. R. Karagas, J. F. Padbury, R. Bueno, D. J. Sugarbaker, R. F. Yeh, J. K. Wiencke and K. T. Kelsey (2009). "Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context." PLoS Genet **5**(8): e1000602.

Dang, W., K. K. Steffen, R. Perry, J. A. Dorsey, F. B. Johnson, A. Shilatifard, M. Kaeberlein, B. K. Kennedy and S. L. Berger (2009). "Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan." Nature **459**(7248): 802-807.

Dashwood, R. H. and E. Ho (2007). "Dietary histone deacetylase inhibitors: from cells to mice to man." Semin Cancer Biol **17**(5): 363-369.

Day, K., L. L. Waite, A. Thalacker-Mercer, A. West, M. M. Bamman, J. D. Brooks, R. M. Myers and D. Absher (2013). "Differential DNA methylation with age displays both common and dynamic features across human tissues that are influenced by CpG landscape." Genome Biol **14**(9): R102.

Dayeh, T., P. Volkov, S. Salo, E. Hall, E. Nilsson, A. H. Olsson, C. L. Kirkpatrick, C. B. Wollheim, L. Eliasson, T. Ronn, K. Bacos and C. Ling (2014). "Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion." PLoS Genet **10**(3): e1004160.

De Ugarte, D. A., K. Morizono, A. Elbarbary, Z. Alfonso, P. A. Zuk, M. Zhu, J. L. Drago, P. Ashjian, B. Thomas, P. Benhaim, I. Chen, J. Fraser and M. H. Hedrick (2003). "Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow." Cells Tissues Organs **174**(3): 101-109.

de Vegt, F., J. M. Dekker, A. Jager, E. Hienkens, P. J. Kostense, C. D. Stehouwer, G. Nijpels, L. M. Bouter and R. J. Heine (2001). "Relation of impaired fasting and postload glucose with incident type 2 diabetes in a Dutch population: The Hoorn Study." JAMA **285**(16): 2109-2113.

Dedeurwaerder, S., M. Defrance, M. Bizet, E. Calonne, G. Bontempi and F. Fuks (2014). "A comprehensive overview of Infinium HumanMethylation450 data processing." Brief Bioinform **15**(6): 929-941.

Dedeurwaerder, S., M. Defrance, E. Calonne, H. Denis, C. Sotiriou and F. Fuks (2011). "Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology." Epigenomics **3**(6): 771-784.

Deelen, J., M. Beekman, H. W. Uh, Q. Helmer, M. Kuningas, L. Christiansen, D. Kremer, R. van der Breggen, H. E. Suchiman, N. Lakenberg, E. B. van den Akker, W. M. Passtoors, H. Tiemeier, D. van Heemst, A. J. de Craen, F. Rivadeneira, E. J. de Geus, M. Perola, F. J. van der Ouderaa, D. A. Gunn, D. I. Boomsma, A. G. Uitterlinden, K.

Christensen, C. M. van Duijn, B. T. Heijmans, J. J. Houwing-Duistermaat, R. G. Westendorp and P. E. Slagboom (2011). "Genome-wide association study identifies a single major locus contributing to survival into old age; the APOE locus revisited." *Aging Cell* **10**(4): 686-698.

Delaval, K. and R. Feil (2004). "Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting." *Curr Opin Genet Dev* **14**(2): 188-195.

Dickson, K. M., C. B. Gustafson, J. I. Young, S. Zuchner and G. Wang (2013). "Ascorbate-induced generation of 5-hydroxymethylcytosine is unaffected by varying levels of iron and 2-oxoglutarate." *Biochem Biophys Res Commun* **439**(4): 522-527.

Doherty, L. F., J. G. Bromer, Y. Zhou, T. S. Aldad and H. S. Taylor (2010). "In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer." *Horm Cancer* **1**(3): 146-155.

Doi, A., I. H. Park, B. Wen, P. Murakami, M. J. Aryee, R. Irizarry, B. Herb, C. Ladd-Acosta, J. Rho, S. Loewer, J. Miller, T. Schlaeger, G. Q. Daley and A. P. Feinberg (2009). "Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts." *Nat Genet* **41**(12): 1350-1353.

Dolinoy, D. C., D. Huang and R. L. Jirtle (2007). "Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(32): 13056-13061.

Du, P., X. Zhang, C. C. Huang, N. Jafari, W. A. Kibbe, L. Hou and S. M. Lin (2010). "Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis." *BMC Bioinformatics* **11**: 587.

Du, Q., P. L. Luu, C. Stirzaker and S. J. Clark (2015). "Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome." *Epigenomics*: 1-23.

Dupuis, J., C. Langenberg, I. Prokopenko, R. Saxena, N. Soranzo, A. U. Jackson, E. Wheeler, N. L. Glazer, N. Bouatia-Naji, A. L. Gloyn, C. M. Lindgren, R. Magi, A. P. Morris, J. Randall, T. Johnson, P. Elliott, D. Rybin, G. Thorleifsson, V. Steinthorsdottir, P. Henneman, H. Grallert, A. Dehghan, J. J. Hottenga, C. S. Franklin, P. Navarro, K. Song, A. Goel, J. R. Perry, J. M. Egan, T. Lajunen, N. Grarup, T. Sparso, A. Doney, B. F. Voight, H. M. Stringham, M. Li, S. Kanoni, P. Shrader, C. Cavalcanti-Proenca, M. Kumari, L. Qi, N. J.

Timpson, C. Gieger, C. Zabena, G. Rocheleau, E. Ingelsson, P. An, J. O'Connell, J. Luan, A. Elliott, S. A. McCarroll, F. Payne, R. M. Roccascocca, F. Pattou, P. Sethupathy, K. Ardlie, Y. Ariyurek, B. Balkau, P. Barter, J. P. Beilby, Y. Ben-Shlomo, R. Benediktsson, A. J. Bennett, S. Bergmann, M. Bochud, E. Boerwinkle, A. Bonnefond, L. L. Bonnycastle, K. Borch-Johnsen, Y. Bottcher, E. Brunner, S. J. Bumpstead, G. Charpentier, Y. D. Chen, P. Chines, R. Clarke, L. J. Coin, M. N. Cooper, M. Cornelis, G. Crawford, L. Crisponi, I. N. Day, E. J. de Geus, J. Delplanque, C. Dina, M. R. Erdos, A. C. Fedson, A. Fischer-Rosinsky, N. G. Forouhi, C. S. Fox, R. Frants, M. G. Franzosi, P. Galan, M. O. Goodarzi, J. Graessler, C. J. Groves, S. Grundy, R. Gwilliam, U. Gyllensten, S. Hadjadj, G. Hallmans, N. Hammond, X. Han, A. L. Hartikainen, N. Hassanali, C. Hayward, S. C. Heath, S. Herberg, C. Herder, A. A. Hicks, D. R. Hillman, A. D. Hingorani, A. Hofman, J. Hui, J. Hung, B. Isomaa, P. R. Johnson, T. Jorgensen, A. Jula, M. Kaakinen, J. Kaprio, Y. A. Kesaniemi, M. Kivimaki, B. Knight, S. Koskinen, P. Kovacs, K. O. Kyvik, G. M. Lathrop, D. A. Lawlor, O. Le Bacquer, C. Lecoeur, Y. Li, V. Lyssenko, R. Mahley, M. Mangino, A. K. Manning, M. T. Martinez-Larrad, J. B. McAteer, L. J. McCulloch, R. McPherson, C. Meisinger, D. Melzer, D. Meyre, B. D. Mitchell, M. A. Morken, S. Mukherjee, S. Naitza, N. Narisu, M. J. Neville, B. A. Oostra, M. Orru, R. Pakyz, C. N. Palmer, G. Paolisso, C. Pattaro, D. Pearson, J. F. Peden, N. L. Pedersen, M. Perola, A. F. Pfeiffer, I. Pichler, O. Polasek, D. Posthuma, S. C. Potter, A. Pouta, M. A. Province, B. M. Psaty, W. Rathmann, N. W. Rayner, K. Rice, S. Ripatti, F. Rivadeneira, M. Roden, O. Rolandsson, A. Sandbaek, M. Sandhu, S. Sanna, A. A. Sayer, P. Scheet, L. J. Scott, U. Seedorf, S. J. Sharp, B. Shields, G. Sigurdsson, E. J. Sijbrands, A. Silveira, L. Simpson, A. Singleton, N. L. Smith, U. Sovio, A. Swift, H. Syddall, A. C. Syvanen, T. Tanaka, B. Thorand, J. Tichet, A. Tonjes, T. Tuomi, A. G. Uitterlinden, K. W. van Dijk, M. van Hoek, D. Varma, S. Visvikis-Siest, V. Vitart, N. Vogelzangs, G. Waeber, P. J. Wagner, A. Walley, G. B. Walters, K. L. Ward, H. Watkins, M. N. Weedon, S. H. Wild, G. Willemsen, J. C. Witteman, J. W. Yarnell, E. Zeggini, D. Zelenika, B. Zethelius, G. Zhai, J. H. Zhao, M. C. Zillikens, D. Consortium, G. Consortium, B. C. Global, I. B. Borecki, R. J. Loos, P. Meneton, P. K. Magnusson, D. M. Nathan, G. H. Williams, A. T. Hattersley, K. Silander, V. Salomaa, G. D. Smith, S. R. Bornstein, P. Schwarz, J. Spranger, F. Karpe, A. R. Shuldiner, C. Cooper, G. V. Dedoussis, M. Serrano-Rios, A. D. Morris, L. Lind, L. J. Palmer, F. B. Hu, P. W. Franks, S. Ebrahim, M. Marmot, W. H. Kao, J. S. Pankow, M. J. Sampson, J. Kuusisto, M. Laakso, T. Hansen, O. Pedersen,

P. P. Pramstaller, H. E. Wichmann, T. Illig, I. Rudan, A. F. Wright, M. Stumvoll, H. Campbell, J. F. Wilson, C. Anders Hamsten on behalf of Procardis, M. investigators, R. N. Bergman, T. A. Buchanan, F. S. Collins, K. L. Mohlke, J. Tuomilehto, T. T. Valle, D. Altshuler, J. I. Rotter, D. S. Siscovick, B. W. Penninx, D. I. Boomsma, P. Deloukas, T. D. Spector, T. M. Frayling, L. Ferrucci, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, K. Stefansson, C. M. van Duijn, Y. S. Aulchenko, A. Cao, A. Scuteri, D. Schlessinger, M. Uda, A. Ruukonen, M. R. Jarvelin, D. M. Waterworth, P. Vollenweider, L. Peltonen, V. Mooser, G. R. Abecasis, N. J. Wareham, R. Sladek, P. Froguel, R. M. Watanabe, J. B. Meigs, L. Groop, M. Boehnke, M. I. McCarthy, J. C. Florez and I. Barroso (2010). "New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk." Nat Genet **42**(2): 105-116.

Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, L. H. Huang, R. M. Midgett, K. C. Kuo, R. A. McCune and C. Gehrke (1982). "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells." Nucleic Acids Res **10**(8): 2709-2721.

Erices, A., P. Conget and J. J. Minguell (2000). "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood." Br J Haematol **109**(1): 235-242.

Ernst, J. and M. Kellis (2010). "Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome." Nat Biotechnol **28**(8): 817-825.

Ernst, J., P. Kheradpour, T. S. Mikkelsen, N. Shores, L. D. Ward, C. B. Epstein, X. Zhang, L. Wang, R. Issner, M. Coyne, M. Ku, T. Durham, M. Kellis and B. E. Bernstein (2011). "Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types." Nature **473**(7345): 43-49.

Esteller, M. (2007). "Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps." Nat Rev Genet **8**(4): 286-298.

Fan, M., W. Chen, W. Liu, G. Q. Du, S. L. Jiang, W. C. Tian, L. Sun, R. K. Li and H. Tian (2010). "The effect of age on the efficacy of human mesenchymal stem cell transplantation after a myocardial infarction." Rejuvenation Res **13**(4): 429-438.

Fang, M., D. Chen and C. S. Yang (2007). "Dietary polyphenols may affect DNA methylation." J Nutr **137**(1 Suppl): 223S-228S.

Feil, R. and M. F. Fraga (2011). "Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications." Nat Rev Genet **13**(2): 97-109.

Feinberg, A. P., M. Oshimura and J. C. Barrett (2002). "Epigenetic mechanisms in human disease." Cancer Res **62**(22): 6784-6787.

Feinberg, A. P. and B. Tycko (2004). "The history of cancer epigenetics." Nat Rev Cancer **4**(2): 143-153.

Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts." Nature **301**(5895): 89-92.

Feng, J., N. Shao, K. E. Szulwach, V. Vialou, J. Huynh, C. Zhong, T. Le, D. Ferguson, M. E. Cahill, Y. Li, J. W. Koo, E. Ribeiro, B. Labonte, B. M. Laitman, D. Estey, V. Stockman, P. Kennedy, T. Courousse, I. Mensah, G. Turecki, K. F. Faull, G. L. Ming, H. Song, G. Fan, P. Casaccia, L. Shen, P. Jin and E. J. Nestler (2015). "Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action." Nat Neurosci **18**(4): 536-544.

Fernandez, A. F., Y. Assenov, J. I. Martin-Subero, B. Balint, R. Siebert, H. Taniguchi, H. Yamamoto, M. Hidalgo, A. C. Tan, O. Galm, I. Ferrer, M. Sanchez-Céspedes, A. Villanueva, J. Carmona, J. V. Sanchez-Mut, M. Berdasco, V. Moreno, G. Capella, D. Monk, E. Ballestar, S. Ropero, R. Martinez, M. Sanchez-Carbayo, F. Prosper, X. Agirre, M. F. Fraga, O. Grana, L. Perez-Jurado, J. Mora, S. Puig, J. Prat, L. Badimon, A. A. Puca, S. J. Meltzer, T. Lengauer, J. Bridgewater, C. Bock and M. Esteller (2012). "A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples." Genome Res **22**(2): 407-419.

Fernandez, A. F. and M. F. Fraga (2011). "The effects of the dietary polyphenol resveratrol on human healthy aging and lifespan." Epigenetics **6**(7): 870-874.

Fink, R. I., O. G. Kolterman, J. Griffin and J. M. Olefsky (1983). "Mechanisms of insulin resistance in aging." J Clin Invest **71**(6): 1523-1535.

Flanagan, J. M., V. Pependikyte, N. Pozdniakovaite, M. Sobolev, A. Assadzadeh, A. Schumacher, M. Zangeneh, L. Lau, C. Virtanen, S. C. Wang and A. Petronis (2006). "Intra- and interindividual epigenetic variation in human germ cells." Am J Hum Genet **79**(1): 67-84.

Fleming, J. L., T. H. Huang and A. E. Toland (2008). "The role of parental and grandparental epigenetic alterations in familial cancer risk." Cancer Res **68**(22): 9116-9121.

Fraga, M. F. (2009). "Genetic and epigenetic regulation of aging." Curr Opin Immunol **21**(4): 446-453.

Fraga, M. F., E. Ballestar, M. F. Paz, S. Ropero, F. Setien, M. L. Ballestar, D. Heine-Suner, J. C. Cigudosa, M. Urioste, J. Benitez, M. Boix-Chornet, A. Sanchez-Aguilera, C. Ling, E. Carlsson, P. Poulsen, A. Vaag, Z. Stephan, T. D. Spector, Y. Z. Wu, C. Plass and M. Esteller (2005). "Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(30): 10604-10609.

Fraga, M. F., E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, G. Schotta, T. Bonaldi, C. Haydon, S. Ropero, K. Petrie, N. G. Iyer, A. Perez-Rosado, E. Calvo, J. A. Lopez, A. Cano, M. J. Calasanz, D. Colomer, M. A. Piris, N. Ahn, A. Imhof, C. Caldas, T. Jenuwein and M. Esteller (2005). "Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer." Nat Genet **37**(4): 391-400.

Fraga, M. F. and M. Esteller (2007). "Epigenetics and aging: the targets and the marks." Trends Genet **23**(8): 413-418.

Friedenstein, A. J., S. Piatetzky, II and K. V. Petrakova (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." J Embryol Exp Morphol **16**(3): 381-390.

Furuichi, Y., Y. Wataya, H. Hayatsu and T. Ukita (1970). "Chemical modification of tRNA-Tyr-yeast with bisulfite. A new method to modify isopentenyladenosine residue." Biochem Biophys Res Commun **41**(5): 1185-1191.

Fuso, A., V. Nicolia, A. Pasqualato, M. T. Fiorenza, R. A. Cavallaro and S. Scarpa (2011). "Changes in Presenilin 1 gene methylation pattern in diet-induced B vitamin deficiency." Neurobiol Aging **32**(2): 187-199.

Gage, P. J., C. Kuang and A. L. Zacharias (2014). "The homeodomain transcription factor PITX2 is required for specifying correct cell fates and establishing angiogenic privilege in the developing cornea." Dev Dyn **243**(11): 1391-1400.

Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." J Mol Biol **196**(2): 261-282.

Geiger, H. and K. L. Rudolph (2009). "Aging in the lympho-hematopoietic stem cell compartment." Trends Immunol **30**(7): 360-365.

Glenn, J. D. and K. A. Whartenby (2014). "Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy." World J Stem Cells **6**(5): 526-539.

Globisch, D., M. Munzel, M. Muller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Bruckl, M. Biel and T. Carell (2010). "Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates." PLoS One **5**(12): e15367.

Graff, J. and I. M. Mansuy (2008). "Epigenetic codes in cognition and behaviour." Behav Brain Res **192**(1): 70-87.

Gross, S., Y. Krause, M. Wuelling and A. Vortkamp (2012). "Hoxa11 and Hoxd11 regulate chondrocyte differentiation upstream of Runx2 and Shox2 in mice." PLoS One **7**(8): e43553.

Gu, T. P., F. Guo, H. Yang, H. P. Wu, G. F. Xu, W. Liu, Z. G. Xie, L. Shi, X. He, S. G. Jin, K. Iqbal, Y. G. Shi, Z. Deng, P. E. Szabo, G. P. Pfeifer, J. Li and G. L. Xu (2011). "The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes." Nature **477**(7366): 606-610.

Guintivano, J., M. J. Aryee and Z. A. Kaminsky (2013). "A cell epigenotype specific model for the correction of brain cellular heterogeneity bias and its application to age, brain region and major depression." Epigenetics **8**(3): 290-302.

Guitton, A. E. and F. Berger (2005). "Control of reproduction by Polycomb Group complexes in animals and plants." Int J Dev Biol **49**(5-6): 707-716.

Hahn, M. A., T. Hahn, D. H. Lee, R. S. Esworthy, B. W. Kim, A. D. Riggs, F. F. Chu and G. P. Pfeifer (2008). "Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation." Cancer Res **68**(24): 10280-10289.

Hales, C. N., D. J. Barker, P. M. Clark, L. J. Cox, C. Fall, C. Osmond and P. D. Winter (1991). "Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64." BMJ **303**(6809): 1019-1022.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hannum, G., J. Guinney, L. Zhao, L. Zhang, G. Hughes, S. Sada, B. Klotzle, M. Bibikova, J. B. Fan, Y. Gao, R. Deconde, M. Chen, I. Rajapakse, S. Friend, T. Ideker and K. Zhang (2013). "Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates." Mol Cell **49**(2): 359-367.

Hashimoto, H., Y. Liu, A. K. Upadhyay, Y. Chang, S. B. Howerton, P. M. Vertino, X. Zhang and X. Cheng (2012). "Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation." Nucleic Acids Res **40**(11): 4841-4849.

Hashimoto, H., X. Zhang and X. Cheng (2012). "Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation." Nucleic Acids Res **40**(17): 8276-8284.

He, Y. F., B. Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C. X. Song, K. Zhang, C. He and G. L. Xu (2011). "Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA." Science **333**(6047): 1303-1307.

Heard, E. (2005). "Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome." Curr Opin Genet Dev **15**(5): 482-489.

Heijmans, B. T., E. W. Tobi, A. D. Stein, H. Putter, G. J. Blauw, E. S. Susser, P. E. Slagboom and L. H. Lumey (2008). "Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(44): 17046-17049.

Hendrich, B. and A. Bird (1998). "Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins." Mol Cell Biol **18**(11): 6538-6547.

Henning, S. M., P. Wang, C. L. Carpenter and D. Heber (2013). "Epigenetic effects of green tea polyphenols in cancer." Epigenomics **5**(6): 729-741.

Herman, J. G. and S. B. Baylin (2003). "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." N Engl J Med **349**(21): 2042-2054.

Hermann, A., C. List, H. J. Habisch, V. Vukicevic, M. Ehrhart-Bornstein, R. Brenner, P. Bernstein, S. Fickert and A. Storch (2010). "Age-dependent neuroectodermal differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells: limitations for autologous cell replacement strategies." Cytotherapy **12**(1): 17-30.

Herskind, A. M., M. McGue, N. V. Holm, T. I. Sorensen, B. Harvald and J. W. Vaupel (1996). "The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900." Hum Genet **97**(3): 319-323.

Heyn, H., N. Li, H. J. Ferreira, S. Moran, D. G. Pisano, A. Gomez, J. Diez, J. V. Sanchez-Mut, F. Setien, F. J. Carmona, A. A. Puca, S. Sayols, M. A. Pujana, J. Serra-Musach, I. Iglesias-Platas, F. Formiga, A. F. Fernandez, M. F. Fraga, S. C. Heath, A. Valencia, I. G. Gut, J. Wang and M. Esteller (2012). "Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(26): 10522-10527.

Heyn, H., S. Moran and M. Esteller (2013). "Aberrant DNA methylation profiles in the premature aging disorders Hutchinson-Gilford Progeria and Werner syndrome." Epigenetics **8**(1): 28-33.

Hou, L., X. Zhang, Y. Zheng, S. Wang, C. Dou, L. Guo, H. M. Byun, V. Motta, J. McCracken, A. Diaz, C. M. Kang, P. Koutrakis, P. A. Bertazzi, J. Li, J. Schwartz and A. A. Baccarelli (2014). "Altered methylation in tandem repeat element and elemental component levels in inhalable air particles." Environ Mol Mutagen **55**(3): 256-265.

Huber, K., G. Doyon, J. Plaks, E. Fyne, J. W. Mellors and N. Sluis-Cremer (2011). "Inhibitors of histone deacetylases: correlation between isoform specificity and reactivation of HIV type 1 (HIV-1) from latently infected cells." J Biol Chem **286**(25): 22211-22218.

Huidobro, C., A. F. Fernandez and M. F. Fraga (2013). "Aging epigenetics: causes and consequences." Mol Aspects Med **34**(4): 765-781.

In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur, G. M. de Groot-Swings, F. H. Claas, W. E. Fibbe and H. H. Kanhai (2004). "Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta." Stem Cells **22**(7): 1338-1345.

Ingram, D. K., R. Weindruch, E. L. Spangler, J. R. Freeman and R. L. Walford (1987). "Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice." J Gerontol **42**(1): 78-81.

Inoue, A. and Y. Zhang (2011). "Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos." Science **334**(6053): 194.

Iqbal, K., S. G. Jin, G. P. Pfeifer and P. E. Szabo (2011). "Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(9): 3642-3647.

Irizarry, R. A., C. Ladd-Acosta, B. Wen, Z. Wu, C. Montano, P. Onyango, H. Cui, K. Gabo, M. Rongione, M. Webster, H. Ji, J. B. Potash, S. Sabunciyan and A. P. Feinberg (2009). "The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores." Nat Genet **41**(2): 178-186.

Issa, J. P. (2003). "Age-related epigenetic changes and the immune system." Clin Immunol **109**(1): 103-108.

Issa, J. P. (2014). "Aging and epigenetic drift: a vicious cycle." J Clin Invest **124**(1): 24-29.

Ito, S., L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He and Y. Zhang (2011). "Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine." Science **333**(6047): 1300-1303.

Iwata, A., K. Nagata, H. Hatsuta, H. Takuma, M. Bundo, K. Iwamoto, A. Tamaoka, S. Murayama, T. Saido and S. Tsuji (2014). "Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation." Hum Mol Genet **23**(3): 648-656.

Iyer, L. M., M. Tahiliani, A. Rao and L. Aravind (2009). "Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids." Cell Cycle **8**(11): 1698-1710.

Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." Nat Genet **33** **Suppl**: 245-254.

Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-1080.

Jeong, S., G. Liang, S. Sharma, J. C. Lin, S. H. Choi, H. Han, C. B. Yoo, G. Egger, A. S. Yang and P. A. Jones (2009). "Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA." Mol Cell Biol **29**(19): 5366-5376.

Jin, S. G., S. Kadam and G. P. Pfeifer (2010). "Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine." Nucleic Acids Res **38**(11): e125.

Johansson, A., S. Enroth and U. Gyllensten (2013). "Continuous Aging of the Human DNA Methylome Throughout the Human Lifespan." PLoS One **8**(6): e67378.

Jones, A., A. E. Teschendorff, Q. Li, J. D. Hayward, A. Kannan, T. Mould, J. West, M. Zikan, D. Cibula, H. Fiegl, S. H. Lee, E. Wik, R. Hadwin, R. Arora, C. Lemech, H. Turunen, P. Pakarinen, I. J. Jacobs, H. B. Salvesen, M. K. Bagchi, I. C. Bagchi and M. Widschwendter (2013). "Role of DNA methylation and epigenetic silencing of HAND2 in endometrial cancer development." PLoS Med **10**(11): e1001551.

Kaminsky, Z. A., T. Tang, S. C. Wang, C. Ptak, G. H. Oh, A. H. Wong, L. A. Feldcamp, C. Virtanen, J. Halfvarson, C. Tysk, A. F. McRae, P. M. Visscher, G. W.

Montgomery, Gottesman, II, N. G. Martin and A. Petronis (2009). "DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins." Nat Genet **41**(2): 240-245.

Kaneda, R., S. Takada, Y. Yamashita, Y. L. Choi, M. Nonaka-Sarukawa, M. Soda, Y. Misawa, T. Isomura, K. Shimada and H. Mano (2009). "Genome-wide histone methylation profile for heart failure." Genes Cells **14**(1): 69-77.

Kawakami, K., A. Nakamura, A. Ishigami, S. Goto and R. Takahashi (2009). "Age-related difference of site-specific histone modifications in rat liver." Biogerontology **10**(4): 415-421.

Keyes, M. K., H. Jang, J. B. Mason, Z. Liu, J. W. Crott, D. E. Smith, S. Friso and S. W. Choi (2007). "Older age and dietary folate are determinants of genomic and p16-specific DNA methylation in mouse colon." J Nutr **137**(7): 1713-1717.

Kilgore, M., C. A. Miller, D. M. Fass, K. M. Hennig, S. J. Haggarty, J. D. Sweatt and G. Rumbaugh (2010). "Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." Neuropsychopharmacology **35**(4): 870-880.

Kim, J. H., L. S. Rozek, A. S. Soliman, M. A. Sartor, A. Hablas, I. A. Seifeldin, J. A. Colacino, C. Weinhouse, M. S. Nahar and D. C. Dolinoy (2013). "Bisphenol A-associated epigenomic changes in prepubescent girls: a cross-sectional study in Gharbiah, Egypt." Environ Health **12**: 33.

Kornberg, R. D. and Y. Lorch (1999). "Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome." Cell **98**(3): 285-294.

Kotsopoulos, J., K. J. Sohn and Y. I. Kim (2008). "Postweaning dietary folate deficiency provided through childhood to puberty permanently increases genomic DNA methylation in adult rat liver." J Nutr **138**(4): 703-709.

Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.

Kriaucionis, S. and N. Heintz (2009). "The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain." Science **324**(5929): 929-930.

Ku, M., R. P. Koche, E. Rheinbay, E. M. Mendenhall, M. Endoh, T. S. Mikkelsen, A. Presser, C. Nusbaum, X. Xie, A. S. Chi, M. Adli, S. Kasif, L. M. Ptaszek, C. A. Cowan, E. S. Lander, H. Koseki and B. E. Bernstein (2008). "Genomewide analysis of PRC1 and

PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains." PLoS Genet **4**(10): e1000242.

Lee, K. K. and J. L. Workman (2007). "Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(4): 284-295.

Leek, J. T., W. E. Johnson, H. S. Parker, A. E. Jaffe and J. D. Storey (2012). "The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments." Bioinformatics **28**(6): 882-883.

Lepeule, J., M. A. Bind, A. A. Baccarelli, P. Koutrakis, L. Tarantini, A. Litonjua, D. Sparrow, P. Vokonas and J. D. Schwartz (2014). "Epigenetic influences on associations between air pollutants and lung function in elderly men: the normative aging study." Environ Health Perspect **122**(6): 566-572.

Li, Y., L. Liu and T. O. Tollefsbol (2010). "Glucose restriction can extend normal cell lifespan and impair precancerous cell growth through epigenetic control of hTERT and p16 expression." FASEB J **24**(5): 1442-1453.

Li, Z., C. Liu, Z. Xie, P. Song, R. C. Zhao, L. Guo, Z. Liu and Y. Wu (2011). "Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation." PLoS One **6**(6): e20526.

Lin, S. J., M. Kaeberlein, A. A. Andalis, L. A. Sturtz, P. A. Defossez, V. C. Culotta, G. R. Fink and L. Guarente (2002). "Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration." Nature **418**(6895): 344-348.

Ling, C., S. Del Guerra, R. Lupi, T. Ronn, C. Granhall, H. Luthman, P. Masiello, P. Marchetti, L. Groop and S. Del Prato (2008). "Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion." Diabetologia **51**(4): 615-622.

Lister, R., M. Pelizzola, R. H. Dowen, R. D. Hawkins, G. Hon, J. Tonti-Filippini, J. R. Nery, L. Lee, Z. Ye, Q. M. Ngo, L. Edsall, J. Antosiewicz-Bourget, R. Stewart, V. Ruotti, A. H. Millar, J. A. Thomson, B. Ren and J. R. Ecker (2009). "Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences." Nature **462**(7271): 315-322.

Liu, M. and Z. C. Han (2008). "Mesenchymal stem cells: biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy." J Cell Mol Med **12**(4): 1155-1168.

Longo, V. D. and B. K. Kennedy (2006). "Sirtuins in aging and age-related disease." Cell **126**(2): 257-268.

Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer (2013). "The hallmarks of aging." Cell **153**(6): 1194-1217.

Lord, J. and C. Cruchaga (2014). "The epigenetic landscape of Alzheimer's disease." Nat Neurosci **17**(9): 1138-1140.

Maegawa, S., G. Hinkal, H. S. Kim, L. Shen, L. Zhang, J. Zhang, N. Zhang, S. Liang, L. A. Donehower and J. P. Issa (2010). "Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice." Genome Res **20**(3): 332-340.

Maiti, A. and A. C. Drohat (2011). "Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites." J Biol Chem **286**(41): 35334-35338.

Maksimovic, J., L. Gordon and A. Oshlack (2012). "SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips." Genome Biol **13**(6): R44.

Martin, C., R. Cao and Y. Zhang (2006). "Substrate preferences of the EZH2 histone methyltransferase complex." J Biol Chem **281**(13): 8365-8370.

Mayer, W., A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele and T. Haaf (2000). "Demethylation of the zygotic paternal genome." Nature **403**(6769): 501-502.

Mellen, M., P. Ayata, S. Dewell, S. Kriaucionis and N. Heintz (2012). "MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system." Cell **151**(7): 1417-1430.

Meshorer, E., D. Yellajoshula, E. George, P. J. Scambler, D. T. Brown and T. Misteli (2006). "Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells." Dev Cell **10**(1): 105-116.

Minor, E. A., B. L. Court, J. I. Young and G. Wang (2013). "Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine." J Biol Chem **288**(19): 13669-13674.

Mohandas, T., R. S. Sparkes and L. J. Shapiro (1981). "Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation." Science **211**(4480): 393-396.

Montgomery, R. L., C. A. Davis, M. J. Potthoff, M. Haberland, J. Fielitz, X. Qi, J. A. Hill, J. A. Richardson and E. N. Olson (2007). "Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility." Genes Dev **21**(14): 1790-1802.

Morgan, H. D., F. Santos, K. Green, W. Dean and W. Reik (2005). "Epigenetic reprogramming in mammals." Hum Mol Genet **14 Spec No 1**: R47-58.

Mostoslavsky, R., K. F. Chua, D. B. Lombard, W. W. Pang, M. R. Fischer, L. Gellon, P. Liu, G. Mostoslavsky, S. Franco, M. M. Murphy, K. D. Mills, P. Patel, J. T. Hsu, A. L. Hong, E. Ford, H. L. Cheng, C. Kennedy, N. Nunez, R. Bronson, D. Frendewey, W. Auerbach, D. Valenzuela, M. Karow, M. O. Hottiger, S. Hursting, J. C. Barrett, L. Guarente, R. Mulligan, B. Demple, G. D. Yancopoulos and F. W. Alt (2006). "Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6." Cell **124**(2): 315-329.

Muller, J. and J. A. Kassis (2006). "Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in Drosophila." Curr Opin Genet Dev **16**(5): 476-484.

Munoz-Najar, U. and J. M. Sedivy (2011). "Epigenetic control of aging." Antioxid Redox Signal **14**(2): 241-259.

Natelson, B. H., J. E. Ottenweller, R. J. Servatius, S. Drastal, M. T. Bergen and W. N. Tapp (1992). "Effect of stress and food restriction on blood pressure and lifespan of Dahl salt-sensitive rats." J Hypertens **10**(12): 1457-1462.

Nebel, A., R. Kleindorp, A. Caliebe, M. Nothnagel, H. Blanche, O. Junge, M. Wittig, D. Ellinghaus, F. Flachsbar, H. E. Wichmann, T. Meitinger, S. Nikolaus, A. Franke, M. Krawczak, M. Lathrop and S. Schreiber (2011). "A genome-wide association study confirms APOE as the major gene influencing survival in long-lived individuals." Mech Ageing Dev **132**(6-7): 324-330.

Nestor, C. E., R. Ottaviano, J. Reddington, D. Sproul, D. Reinhardt, D. Dunican, E. Katz, J. M. Dixon, D. J. Harrison and R. R. Meehan (2012). "Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes." Genome Res **22**(3): 467-477.

Nestor, C. E., R. Ottaviano, D. Reinhardt, H. A. Cruickshanks, H. K. Mjoseng, R. C. McPherson, A. Lentini, J. P. Thomson, D. S. Dunican, S. Pennings, S. M. Anderton, M.

Benson and R. R. Meehan (2015). "Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture systems." Genome Biol **16**: 11.

Noort, W. A., A. B. Kruisselbrink, P. S. in't Anker, M. Kruger, R. L. van Bezooijen, R. A. de Paus, M. H. Heemskerk, C. W. Lowik, J. H. Falkenburg, R. Willemze and W. E. Fibbe (2002). "Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice." Exp Hematol **30**(8): 870-878.

Numata, S., T. Ye, T. M. Hyde, X. Guitart-Navarro, R. Tao, M. Wininger, C. Colantuoni, D. R. Weinberger, J. E. Kleinman and B. K. Lipska (2012). "DNA methylation signatures in development and aging of the human prefrontal cortex." Am J Hum Genet **90**(2): 260-272.

O'Rahilly, S. (2009). "Human genetics illuminates the paths to metabolic disease." Nature **462**(7271): 307-314.

Oberdoerffer, P., S. Michan, M. McVay, R. Mostoslavsky, J. Vann, S. K. Park, A. Hartlerode, J. Stegmuller, A. Hafner, P. Loerch, S. M. Wright, K. D. Mills, A. Bonni, B. A. Yankner, R. Scully, T. A. Prolla, F. W. Alt and D. A. Sinclair (2008). "SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging." Cell **135**(5): 907-918.

Oh, J., Y. D. Lee and A. J. Wagers (2014). "Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities." Nat Med **20**(8): 870-880.

Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber and E. Li (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell **99**(3): 247-257.

Osorio, F. G., I. Varela, E. Lara, X. S. Puente, J. Espada, R. Santoro, J. M. Freije, M. F. Fraga and C. Lopez-Otin (2010). "Nuclear envelope alterations generate an aging-like epigenetic pattern in mice deficient in Zmpste24 metalloprotease." Aging Cell **9**(6): 947-957.

Oudet, P., M. Gross-Bellard and P. Chambon (1975). "Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit." Cell **4**(4): 281-300.

Park, I. K., D. Qian, M. Kiel, M. W. Becker, M. Pihalja, I. L. Weissman, S. J. Morrison and M. F. Clarke (2003). "Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells." Nature **423**(6937): 302-305.

Park, J. H., D. A. Stoffers, R. D. Nicholls and R. A. Simmons (2008). "Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1." J Clin Invest **118**(6): 2316-2324.

Park, Y. S., M. Y. Jin, Y. J. Kim, J. H. Yook, B. S. Kim and S. J. Jang (2008). "The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma." Ann Surg Oncol **15**(7): 1968-1976.

Peleg, S., F. Sananbenesi, A. Zovoilis, S. Burkhardt, S. Bahari-Javan, R. C. Agis-Balboa, P. Cota, J. L. Wittnam, A. Gogol-Doering, L. Opitz, G. Salinas-Riester, M. Dettenhofer, H. Kang, L. Farinelli, W. Chen and A. Fischer (2010). "Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice." Science **328**(5979): 753-756.

Penn, N. W., R. Suwalski, C. O'Riley, K. Bojanowski and R. Yura (1972). "The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid." Biochem J **126**(4): 781-790.

Pinney, S. E. (2014). "Mammalian Non-CpG Methylation: Stem Cells and Beyond." Biology (Basel) **3**(4): 739-751.

Pinney, S. E., L. J. Jaeckle Santos, Y. Han, D. A. Stoffers and R. A. Simmons (2011). "Exendin-4 increases histone acetylase activity and reverses epigenetic modifications that silence Pdx1 in the intrauterine growth retarded rat." Diabetologia **54**(10): 2606-2614.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.

Pollina, E. A. and A. Brunet (2011). "Epigenetic regulation of aging stem cells." Oncogene **30**(28): 3105-3126.

Poulsen, P., M. Esteller, A. Vaag and M. F. Fraga (2007). "The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases." Pediatr Res **61**(5 Pt 2): 38R-42R.

Pugh, T. D., T. D. Oberley and R. Weindruch (1999). "Dietary intervention at middle age: caloric restriction but not dehydroepiandrosterone sulfate increases lifespan and lifetime cancer incidence in mice." Cancer Res **59**(7): 1642-1648.

Rai, K., I. J. Huggins, S. R. James, A. R. Karpf, D. A. Jones and B. R. Cairns (2008). "DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45." Cell **135**(7): 1201-1212.

Rakyan, V. K., T. A. Down, S. Maslau, T. Andrew, T. P. Yang, H. Beyan, P. Whittaker, O. T. McCann, S. Finer, A. M. Valdes, R. D. Leslie, P. Deloukas and T. D. Spector (2010). "Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains." Genome Res **20**(4): 434-439.

Rao, X., J. Evans, H. Chae, J. Pilrose, S. Kim, P. Yan, R. L. Huang, H. C. Lai, H. Lin, Y. Liu, D. Miller, J. K. Rhee, Y. W. Huang, F. Gu, J. W. Gray, T. M. Huang and K. P. Nephew (2013). "CpG island shore methylation regulates caveolin-1 expression in breast cancer." Oncogene **32**(38): 4519-4528.

Rauch, T., H. Li, X. Wu and G. P. Pfeifer (2006). "MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells." Cancer Res **66**(16): 7939-7947.

Reik, W. (2007). "Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development." Nature **447**(7143): 425-432.

Rett, A. (1986). "Rett syndrome. History and general overview." Am J Med Genet Suppl **1**: 21-25.

Rodriguez-Paredes, M. and M. Esteller (2011). "Cancer epigenetics reaches mainstream oncology." Nat Med **17**(3): 330-339.

Rogina, B. and S. L. Helfand (2004). "Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(45): 15998-16003.

Rosenbloom, K. R., T. R. Dreszer, J. C. Long, V. S. Malladi, C. A. Sloan, B. J. Raney, M. S. Cline, D. Karolchik, G. P. Barber, H. Clawson, M. Diekhans, P. A. Fujita, M. Goldman, R. C. Gravell, R. A. Harte, A. S. Hinrichs, V. M. Kirkup, R. M. Kuhn, K. Learned, M. Maddren, L. R. Meyer, A. Pohl, B. Rhead, M. C. Wong, A. S. Zweig, D. Haussler and W. J. Kent (2012). "ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser: update 2012." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D912-917.

Rosenbloom, K. R., T. R. Dreszer, M. Pheasant, G. P. Barber, L. R. Meyer, A. Pohl, B. J. Raney, T. Wang, A. S. Hinrichs, A. S. Zweig, P. A. Fujita, K. Learned, B. Rhead, K. E. Smith, R. M. Kuhn, D. Karolchik, D. Haussler and W. J. Kent (2010). "ENCODE whole-

genome data in the UCSC Genome Browser." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D620-625.

Sajadian, S. O., S. Ehnert, H. Vakilian, E. Koutsouraki, G. Damm, D. Seehofer, W. Thasler, S. Dooley, H. Baharvand, B. Sipos and A. K. Nussler (2015). "Induction of active demethylation and 5hmC formation by 5-azacytidine is TET2 dependent and suggests new treatment strategies against hepatocellular carcinoma." Clin Epigenetics **7**(1): 98.

Sandovici, I., N. H. Smith, M. D. Nitert, M. Ackers-Johnson, S. Uribe-Lewis, Y. Ito, R. H. Jones, V. E. Marquez, W. Cairns, M. Tadayyon, L. P. O'Neill, A. Murrell, C. Ling, M. Constanca and S. E. Ozanne (2011). "Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(13): 5449-5454.

Schellenberg, A., Q. Lin, H. Schuler, C. M. Koch, S. Jousen, B. Denecke, G. Walenda, N. Pallua, C. V. Suschek, M. Zenke and W. Wagner (2011). "Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks." Aging (Albany NY) **3**(9): 873-888.

Schuettengruber, B., D. Chourrout, M. Vervoort, B. Leblanc and G. Cavalli (2007). "Genome regulation by polycomb and trithorax proteins." Cell **128**(4): 735-745.

Schwartz, Y. B., T. G. Kahn, D. A. Nix, X. Y. Li, R. Bourgon, M. Biggin and V. Pirrotta (2006). "Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*." Nat Genet **38**(6): 700-705.

Shen, L., Y. Kondo, Y. Guo, J. Zhang, L. Zhang, S. Ahmed, J. Shu, X. Chen, R. A. Waterland and J. P. Issa (2007). "Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters." PLoS Genet **3**(10): 2023-2036.

Shen, S., J. Sandoval, V. A. Swiss, J. Li, J. Dupree, R. J. Franklin and P. Casaccia-Bonnel (2008). "Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency." Nat Neurosci **11**(9): 1024-1034.

Sherry, S. T., M. H. Ward, M. Kholodov, J. Baker, L. Phan, E. M. Smigielski and K. Sirotkin (2001). "dbSNP: the NCBI database of genetic variation." Nucleic Acids Res **29**(1): 308-311.

Shibata, D. (2009). "Inferring human stem cell behaviour from epigenetic drift." J Pathol **217**(2): 199-205.

Shimoda, N., K. Hirose, R. Kaneto, T. Izawa, H. Yokoi, N. Hashimoto and Y. Kikuchi (2014). "No evidence for AID/MBD4-coupled DNA demethylation in zebrafish embryos." PLoS One **9**(12): e114816.

Signer, R. A. and S. J. Morrison (2013). "Mechanisms that regulate stem cell aging and life span." Cell Stem Cell **12**(2): 152-165.

Silva, P. N., C. O. Giguek, M. F. Leal, P. H. Bertolucci, R. W. de Labio, S. L. Payao and A. Smith Mde (2008). "Promoter methylation analysis of SIRT3, SMARCA5, HTERT and CDH1 genes in aging and Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **13**(2): 173-176.

Singh, M. K., M. Petry, B. Haenig, B. Lescher, M. Leitges and A. Kispert (2005). "The T-box transcription factor Tbx15 is required for skeletal development." Mech Dev **122**(2): 131-144.

Stein, A. B., T. A. Jones, T. J. Herron, S. R. Patel, S. M. Day, S. F. Noujaim, M. L. Milstein, M. Klos, P. B. Furspan, J. Jalife and G. R. Dressler (2011). "Loss of H3K4 methylation destabilizes gene expression patterns and physiological functions in adult murine cardiomyocytes." J Clin Invest **121**(7): 2641-2650.

Stewart, S. K., T. J. Morris, P. Guilhamon, H. Bulstrode, M. Bachman, S. Balasubramanian and S. Beck (2015). "oxBS-450K: a method for analysing hydroxymethylation using 450K BeadChips." Methods **72**: 9-15.

Strichman-Almashanu, L. Z., R. S. Lee, P. O. Onyango, E. Perlman, F. Flam, M. B. Frieman and A. P. Feinberg (2002). "A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes." Genome Res **12**(4): 543-554.

Stroud, H., S. Feng, S. Morey Kinney, S. Pradhan and S. E. Jacobsen (2011). "5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells." Genome Biol **12**(6): R54.

Sun, Z., J. Terragni, J. G. Borgaro, Y. Liu, L. Yu, S. Guan, H. Wang, D. Sun, X. Cheng, Z. Zhu, S. Pradhan and Y. Zheng (2013). "High-resolution enzymatic mapping of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mouse embryonic stem cells." Cell Rep **3**(2): 567-576.

Susiarjo, M., I. Sasson, C. Mesaros and M. S. Bartolomei (2013). "Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse." PLoS Genet **9**(4): e1003401.

Swain, J. L., T. A. Stewart and P. Leder (1987). "Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting." Cell **50**(5): 719-727.

Szulwach, K. E., X. Li, Y. Li, C. X. Song, H. Wu, Q. Dai, H. Irier, A. K. Upadhyay, M. Gearing, A. I. Levey, A. Vasanthakumar, L. A. Godley, Q. Chang, X. Cheng, C. He and P. Jin (2011). "5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging." Nat Neurosci **14**(12): 1607-1616.

Tahiliani, M., K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind and A. Rao (2009). "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1." Science **324**(5929): 930-935.

Taiwo, O., G. A. Wilson, W. Emmett, T. Morris, D. Bonnet, E. Schuster, T. Adejumo, S. Beck and D. J. Pearce (2013). "DNA methylation analysis of murine hematopoietic side population cells during aging." Epigenetics **8**(10): 1114-1122.

Tang, W. Y., L. M. Morey, Y. Y. Cheung, L. Birch, G. S. Prins and S. M. Ho (2012). "Neonatal exposure to estradiol/bisphenol A alters promoter methylation and expression of Nsbp1 and Hpcal1 genes and transcriptional programs of Dnmt3a/b and Mbd2/4 in the rat prostate gland throughout life." Endocrinology **153**(1): 42-55.

Teschendorff, A. E., U. Menon, A. Gentry-Maharaj, S. J. Ramus, D. J. Weisenberger, H. Shen, M. Campan, H. Noushmehr, C. G. Bell, A. P. Maxwell, D. A. Savage, E. Mueller-Holzner, C. Marth, G. Kocjan, S. A. Gayther, A. Jones, S. Beck, W. Wagner, P. W. Laird, I. J. Jacobs and M. Widschwendter (2010). "Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer." Genome Res **20**(4): 440-446.

Timp, W. and A. P. Feinberg (2013). "Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host." Nat Rev Cancer **13**(7): 497-510.

Tissenbaum, H. A. and L. Guarente (2001). "Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." Nature **410**(6825): 227-230.

Tong, W. G., W. G. Wierda, E. Lin, S. Q. Kuang, B. N. Bekele, Z. Estrov, Y. Wei, H. Yang, M. J. Keating and G. Garcia-Manero (2010). "Genome-wide DNA methylation

profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact." Epigenetics **5**(6): 499-508.

Tost, J. and I. G. Gut (2007). "DNA methylation analysis by pyrosequencing." Nat Protoc **2**(9): 2265-2275.

Triche, T. J., Jr., D. J. Weisenberger, D. Van Den Berg, P. W. Laird and K. D. Siegmund (2013). "Low-level processing of Illumina Infinium DNA Methylation BeadArrays." Nucleic Acids Res **41**(7): e90.

Tsagaratou, A., T. Aijo, C. W. Lio, X. Yue, Y. Huang, S. E. Jacobsen, H. Lahdesmaki and A. Rao (2014). "Dissecting the dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in T-cell development and differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(32): E3306-3315.

Tsou, J. A., L. Y. Shen, K. D. Siegmund, T. I. Long, P. W. Laird, C. K. Seneviratne, M. N. Koss, H. I. Pass, J. A. Hagen and I. A. Laird-Offringa (2005). "Distinct DNA methylation profiles in malignant mesothelioma, lung adenocarcinoma, and non-tumor lung." Lung Cancer **47**(2): 193-204.

Turner, B. M. (2002). "Cellular memory and the histone code." Cell **111**(3): 285-291.

Urduingio, R. G., J. V. Sanchez-Mut and M. Esteller (2009). "Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies." Lancet Neurol **8**(11): 1056-1072.

Van Esch, H., M. Bauters, J. Ignatius, M. Jansen, M. Raynaud, K. Hollanders, D. Lugtenberg, T. Bienvenu, L. R. Jensen, J. Gecz, C. Moraine, P. Marynen, J. P. Fryns and G. Froyen (2005). "Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males." Am J Hum Genet **77**(3): 442-453.

Veurink, M., M. Koster and L. T. Berg (2005). "The history of DES, lessons to be learned." Pharm World Sci **27**(3): 139-143.

Villar-Garea, A. and M. Esteller (2004). "Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents." Int J Cancer **112**(2): 171-178.

Waddington, C. H. (2012). "The epigenotype. 1942." Int J Epidemiol **41**(1): 10-13.

Wagner, W., P. Horn, S. Bork and A. D. Ho (2008). "Aging of hematopoietic stem cells is regulated by the stem cell niche." Exp Gerontol **43**(11): 974-980.

Walenda, T., S. Bork, P. Horn, F. Wein, R. Saffrich, A. Diehlmann, V. Eckstein, A. D. Ho and W. Wagner (2010). "Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells." J Cell Mol Med **14**(1-2): 337-350.

Wang, H. S., S. C. Hung, S. T. Peng, C. C. Huang, H. M. Wei, Y. J. Guo, Y. S. Fu, M. C. Lai and C. C. Chen (2004). "Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord." Stem Cells **22**(7): 1330-1337.

Weidner, C. I., Q. Lin, C. M. Koch, L. Eisele, F. Beier, P. Ziegler, D. O. Bauerschlag, K. H. Jockel, R. Erbel, T. W. Muhleisen, M. Zenke, T. H. Brummendorf and W. Wagner (2014). "Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites." Genome Biol **15**(2): R24.

Weisenberger, D. J., M. Campan, T. I. Long, M. Kim, C. Woods, E. Fiala, M. Ehrlich and P. W. Laird (2005). "Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight." Nucleic Acids Res **33**(21): 6823-6836.

Wen, L., X. Li, L. Yan, Y. Tan, R. Li, Y. Zhao, Y. Wang, J. Xie, Y. Zhang, C. Song, M. Yu, X. Liu, P. Zhu, X. Li, Y. Hou, H. Guo, X. Wu, C. He, R. Li, F. Tang and J. Qiao (2014). "Whole-genome analysis of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at base resolution in the human brain." Genome Biol **15**(3): R49.

Weng, Y. I., P. Y. Hsu, S. Liyanarachchi, J. Liu, D. E. Deatherage, Y. W. Huang, T. Zuo, B. Rodriguez, C. H. Lin, A. L. Cheng and T. H. Huang (2010). "Epigenetic influences of low-dose bisphenol A in primary human breast epithelial cells." Toxicol Appl Pharmacol **248**(2): 111-121.

West, R. L., J. M. Lee and L. E. Maroun (1995). "Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient." J Mol Neurosci **6**(2): 141-146.

Wierda, R. J., S. B. Geutskens, J. W. Jukema, P. H. Quax and P. J. van den Elsen (2010). "Epigenetics in atherosclerosis and inflammation." J Cell Mol Med **14**(6A): 1225-1240.

Wilson, V. L. and P. A. Jones (1983). "DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells." Science **220**(4601): 1055-1057.

Wilson, V. L., R. A. Smith, S. Ma and R. G. Cutler (1987). "Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age." J Biol Chem **262**(21): 9948-9951.

Wossidlo, M., T. Nakamura, K. Lepikhov, C. J. Marques, V. Zakhartchenko, M. Boiani, J. Arand, T. Nakano, W. Reik and J. Walter (2011). "5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming." *Nat Commun* **2**: 241.

Wu, H. and Y. Zhang (2011). "Tet1 and 5-hydroxymethylation: a genome-wide view in mouse embryonic stem cells." *Cell Cycle* **10**(15): 2428-2436.

Xie, M., C. Hong, B. Zhang, R. F. Lowdon, X. Xing, D. Li, X. Zhou, H. J. Lee, C. L. Maire, K. L. Ligon, P. Gascard, M. Sigaroudinia, T. D. Tlsty, T. Kadlecsek, A. Weiss, H. O'Geen, P. J. Farnham, P. A. Madden, A. J. Mungall, A. Tam, B. Kamoh, S. Cho, R. Moore, M. Hirst, M. A. Marra, J. F. Costello and T. Wang (2013). "DNA hypomethylation within specific transposable element families associates with tissue-specific enhancer landscape." *Nat Genet* **45**(7): 836-841.

Xu, Y., F. Wu, L. Tan, L. Kong, L. Xiong, J. Deng, A. J. Barbera, L. Zheng, H. Zhang, S. Huang, J. Min, T. Nicholson, T. Chen, G. Xu, Y. Shi, K. Zhang and Y. G. Shi (2011). "Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells." *Mol Cell* **42**(4): 451-464.

Yang, X. J. and E. Seto (2007). "HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention." *Oncogene* **26**(37): 5310-5318.

Yildirim, O., R. Li, J. H. Hung, P. B. Chen, X. Dong, L. S. Ee, Z. Weng, O. J. Rando and T. G. Fazio (2011). "Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells." *Cell* **147**(7): 1498-1510.

Yu, M., G. C. Hon, K. E. Szulwach, C. X. Song, L. Zhang, A. Kim, X. Li, Q. Dai, Y. Shen, B. Park, J. H. Min, P. Jin, B. Ren and C. He (2012). "Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome." *Cell* **149**(6): 1368-1380.

Zhang, H., X. Zhang, E. Clark, M. Mulcahey, S. Huang and Y. G. Shi (2010). "TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine." *Cell Res* **20**(12): 1390-1393.

Zykovich, A., A. Hubbard, J. M. Flynn, M. Tarnopolsky, M. F. Fraga, C. Kerksick, D. Ogborn, L. MacNeil, S. D. Mooney and S. Melov (2014). "Genome-wide DNA methylation changes with age in disease-free human skeletal muscle." *Aging Cell* **13**(2): 360-366.

8.1 Anexo I: Publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral

Fruto del trabajo realizado durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, hemos obtenido las siguientes publicaciones:

1. **Toraño EG**, Petrus S, Fernandez AF, Fraga MF. Global DNA hypomethylation in cancer: review of validated methods and clinical significance. *Clin Chem Lab Med*. 2012 Oct 1;50(10):1733-42.
2. Fernández AF, Bayón GF, Urdinguio RG, **Toraño EG**, García MG, Carella A, Petrus-Reurer S, Ferrero C, Martínez-Cambor P, Cubillo I, García-Castro J, Delgado-Calle J, Pérez-Campo FM, Riancho JA, Bueno C, Menéndez P, Mentink A, Mareschi K, Claire F, Fagnani C, Medda E, Toccaceli V, Brescianini S, Moran S, Esteller M, Stolzing A, de Boer J, Nisticò L, Stazi MA, Fraga MF. H3K4me1 marks DNA regions hypomethylated during aging in human stem and differentiated cells. *Genome Res*. 2015 Jan;25(1):27-40.

* **Aportación personal al trabajo:** Mi contribución personal a este trabajo consistió en la participación en la parte experimental correspondiente al estudio de las células madre mesenquimales y la familiarización con el análisis informático del mismo.

3. **Toraño EG**, Bayón GF, del Real A, Sierra M, García MG, Carella A, Belmonte T, Urdinguio RG, Cubillo I, García-Castro J, Delgado-Calle J, Pérez-Campo FM, Riancho JA, Fernández AF y Fraga MF. Age-associated changes of 5-hydroxymethylcytosine in human adult bone-marrow stem stem cells. *JBMR* 2016 (Manuscrito en revision).

* **Aportación personal al trabajo:** Mi contribución personal a este trabajo implicó una participación directa en los aspectos experimentales del mismo. Asimismo colaboré en el análisis informático de los datos, contribuí a la interpretación de los resultados y participé activamente en la elaboración del manuscrito.

4. **Toraño EG**, García MG, Fernández AF y Fraga MF. Epigenetics and environmental stressors. *BioMed Res Int* 2016 (Manuscrito en revision).

Anexo II: Publicaciones no relacionadas con la Tesis Doctoral

A lo largo de la preparación de esta Tesis Doctoral, he tenido la oportunidad de participar en otras líneas de investigación llevadas a cabo en nuestro laboratorio. Estos trabajos han dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. Huidobro C, **Toraño EG**, Fernández AF, Urdinguio RG, Rodríguez RM, Ferrero C, Martínez-Camblor P, Boix L, Bruix J, García-Rodríguez JL, Varela-Rey M, Mato JM, Martínez-Chantar ML, Fraga MF. A DNA methylation signature associated with the epigenetic repression of glycine N-methyltransferase in human hepatocellular carcinoma. *J Mol Med (Berl)*. 2013 Aug;91(8):939-50.
2. **Toraño EG**, Fenandez AF, Urdinguio RG, Fraga MF. Role of epigenetics in neural differentiation. Implications for health and disease. Capítulo del libro: "Molecular mechanisms and physiology of disease: Implications for Epigenetics and Health", Springer Press, Edited by Nilanjana Maulik and Tom Karagiannis.
3. Tajuddin SM, Amaral AF, Fernández AF, Chanock S, Silverman DT, Tardón A, Carrato A, García-Closas M, Jackson BP, **Toraño EG**, Márquez M, Urdinguio RG, García-Closas R, Rothman N, Kogevinas M, Real FX, Fraga MF, Malats N. LINE-1 methylation in leukocyte DNA, interaction with phosphatidylethanolamine N-methyltransferase variants and bladder cancer risk. *Br J Cancer*. 2014 Apr 15;110(8):2123-30.
4. Rodriguez RM, Suarez-Alvarez B, Salvanés R, Huidobro C, **Toraño EG**, Garcia-Perez JL, Lopez-Larrea C, Fernandez AF, Bueno C, Menendez P, Fraga MF. Role of BRD4 in hematopoietic differentiation of embryonic stem cells. *Epigenetics*. 2014 Apr 1;9(4):566-78.
5. Fernández AF, **Toraño EG**, Urdinguio RG, Lana AG, Fernández IA, Fraga MF. The epigenetic basis of adaptation and responses to environmental change: perspective on human reproduction. *Adv Exp Med Biol*. 2014;753:97-117.

6. García MG, **Toraño EG**, Fernández AF and Fraga MF. Clinical Epigenetics in Cancer: Applications in Diagnosis, Prognosis and Therapy. Capítulo de libro: "Epigenetics: Current Research and Emerging Trends". Caister Academic Press, Edited by Brian P. Chadwick.

7. Urdinguio RG, Bayón GF, Dmitrijeva M, **Toraño EG**, Bravo C, Fraga MF, Bassas L, Larriba S, Fernández AF. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. Hum Reprod. 2015 May;30(5):1014-28.