



**Universidad de Santiago de Compostela**  
Facultad de Medicina  
Departamento de Medicina

**Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela**  
Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago  
Laboratorio de Investigación 10

**ANÁLISIS DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS Y BIOMARCADORES  
EPIGENÉTICOS DE LA EDAD EN PACIENTES CON ARTROSIS O  
CON ARTRITIS REUMATOIDE**

PROGRAMA DE DOCTORADO (RD 1393/2007)  
Santiago de Compostela

**TESIS DOCTORAL**  
**Laura Vidal Bralo**  
**2017**



El Dr. Antonio González Martínez-Pedrayo, investigador principal del Laboratorio de Investigación 10 del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, y el Dr. Antonio Mera Varela, jefe de sección del Servicio de Reumatología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y profesor asociado de Medicina del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela durante la elaboración de esta tesis,

CERTIFICAN QUE:

El presente trabajo que lleva por título:

Análisis de la longitud de los telómeros y biomarcadores epigenéticos de la edad en pacientes con artrosis o con artritis reumatoide

Realizado por Laura Vidal Bralo en el Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela bajo nuestra dirección, ha sido revisado y está en disposición de ser presentado para optar al grado de Doctora en Biología.

Fdo: Dr. Antonio González  
Martínez-Pedrayo

**Director**

Fdo: Dr. Antonio Mera Varela

**Tutor**





**A mi pequeña**

*La medicina ha prolongado nuestra vida,  
pero no nos ha facilitado una buena razón para seguir viviendo.*  
Miguel Delibes (1920-2010)



## AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el momento de escribir las últimas líneas de esta tesis. La mayoría de mis compañeros aprovechan este momento para manifestar lo duro y largo que es este tramo, del ya de por sí complicado camino de la vida. De lo agotados que se sienten a pesar de que solo quedan unos metros para alcanzar el objetivo. Sin embargo, en estos últimos meses la vida se ha encargado de recordarme lo que verdaderamente importa, y con esta nueva perspectiva, este trayecto ya no me parece tan terrible. Hay muchas situaciones a las que tienes que enfrentarte solo, en las que por más que te esfuerces y luches no obtendrás mejores resultados y ante las que solo queda la resignación. Pero esta no es una de esas situaciones. Por más agotador que parezca, después del esfuerzo y el tiempo dedicados, obtengo una recompensa y finalmente sale a la luz el trabajo de todos estos años. Tampoco es una situación a la que me haya enfrentado sola, y es por ello que tengo que escribir unas palabras de agradecimiento a las personas que me han ayudado cada día, no solo en esta tesis, sino a lo largo de todo mi camino.

Y es que no estaría aquí, de no ser por la inspiración de una gran maestra y amiga, Irene, que sembró en mí la semilla del amor por la biología. Tampoco hubiera podido comenzar esta tesis sin la comprensión de la profesora Teresa Barral, que proporcionó la pértiga para saltar un gran escollo burocrático al principio de esta etapa.

De ese tedioso Máster de Biomedicina, obligado paso para comenzar esta andadura, me llevo grandes amigos. Jaime y Cynthia en la parte internacional, y por su puesto, mi querida boticaria, ahora renombrada como Laura Boston. Te has convertido en indispensable en las cañas científicas, por tus astutos y mordaces comentarios, que tanto me han hecho reír. Hoy te doy las gracias por cada una de esas carcajadas. He de agradecer también a todo el departamento de Medicina Forense y especialmente a Antonio Salas por acogerme y dirigir mi trabajo final de máster. Has sido un referente del esfuerzo y entusiasmo que se requiere para ser bueno en aquello a lo que uno decide dedicar su vida.

A mi director de tesis, Antonio González, agradecerte la oportunidad de realizar este trabajo en tu laboratorio, con todos los medios disponibles a mi alcance y una buena beca; con la ayuda de tus continuos consejos y recomendaciones. Tu esfuerzo en la supervisión exhaustiva de este trabajo es la marca distintiva que evidencia tu implicación. Gracias también al Servicio de Reumatología por su colaboración, especialmente a Juan-Gómez Reino y a Antonio Mera Varela, por haber aceptado ser tutores de esta tesis, a todos los

médicos y enfermeras y por su puesto a los pacientes. Sin vosotros nuestro trabajo no sería posible.

Gracias a todos los compañeros de laboratorio que cada vez que el camino se volvía escarpado, me empujaron para ayudarme a subir. Aunque en la selección final del trabajo incluido en esta tesis no lo parezca, Manolo, has sido un gran maestro de estadística y un pilar en mis primeros pinitos en la bioinformática. Gracias también al equipo *cardio*, Ana, Vanesa, Diego y Sandra. Los comienzos siempre son duros, pero me acogisteis como una más y con vosotros descubrí el verdadero compañerismo. Gracias a vuestros sabios consejos los westerns salieron, los días duros pasaron, y seréis siempre un ejemplo a seguir del trabajo en equipo.

Aida, sin duda tengo que darte las gracias por acordarte de mí y reclutarme. Tú me enseñaste realmente todos los trucos del genotipado y del manejo de los datos y tu experiencia me ha evitado muchos disgustos. Los vinos y charlas después del trabajo fueron el pilar de nuestra amistad. Sin duda, los echo de menos. También gracias a ti conocí a Marisol, con tu bondad y tu ternura te has hecho un hueco en mi vida.

A las “nuevas” compañeras de esta gran recta final de mi tesis, Lorena, Cristina y Rosario, muchísimas gracias. Sois la alegría y la razón por la cual no me importaría seguir trabajando en esta tesis otros tantos años más. Desde vuestra llegada, el laboratorio se ha convertido en un verdadero hogar. De vosotras he aprendido a sobrellevar cualquier contratiempo con una sonrisa, o un vermú, o con un simple “besos”. Guardaré en mi memoria el “No quiero risas”, la franqueza con la que hablan los de Pamplona y la visita a Londres, aunque sabemos que “Europa está sobrevalorada”. Sabéis que me tendréis al otro lado del teléfono para lo que necesitéis. Gracias también a José por recordarme lo bonito que es enseñar y a Fran, por las galletas de avena y por fomentar el club del corneto.

Al laboratorio ocho le debo el buen ambiente, el apoyo moral, el café de media mañana y los geniales “novatos”, como Sergio y Celia, con los que tantas risas he compartido. A Carmen Conde, su trato siempre amable y su comprensión. Pero sin duda ha sido gracias a ti, Nerea, que *Lab8* ha sido mi segunda casa. Has convertido el compañerismo en amistad. Tu optimismo es fundamental para contrarrestar esa tendencia que tenemos los estudiantes de doctorado de quejarnos por todo y ahogarnos en un vaso de agua. Eres diferente y especial, lluvia fresca que llegó cuando atravesaba un desierto.

Pero tengo que reconocer que el bastón en que me apoyé durante todo este viaje, y sin la cual no estaría hoy aquí, ha sido Carmen. Eres la trabajadora incansable y eficiente que todo el mundo

querría a su lado. Gracias a ti, miles de muestras parecen solo cientos, cientos de experimentos se quedan en decenas, y decenas de trabajos se hacen a la vez. Compañera leal y ahora amiga. Si, has leído bien, amiga. Porque aunque te empeñes en no sufrir por todos los estudiantes de doctorado que van pasando a tu lado, conmigo ya has sufrido. Y aquí estaré siempre que lo necesites.

Y ahora llega sin duda la parte más difícil. Porque sería injusto no agradecer a aquellas personas que a pesar de no haber influido directamente en esta etapa del camino, forman parte de mi vida y me hacen ser quien soy.

Paula, recordaré siempre las noches de “repaso” a última hora que tan buenos resultados nos dieron en la facultad. Sabes que siempre nos tendremos la una a la otra, aunque pase el tiempo y nuestros caminos se separen. Luís, eres un buen amigo, de los que hablan poco y demuestran mucho. Tus abrazos, aunque escasos, son muy reconfortantes. Y María, no creo que sea bueno recordar nuestros comienzos. Me quedo simplemente con tu franqueza, tu lealtad y tus incansables esfuerzos por mantenernos a todos unidos. Y sí, eres la más lista y la más guapa, queda escrito aquí para siempre. Hemos tenido cenas de la facultad, charlas de laboratorio, cañas de máster y excursiones a Lalín juntos que forman parte de los recuerdos de los mejores años de mi vida.

A mis queridas gemas Laura y María, a mi peque Nerea, a mi tocaya Lala, y a Olga, por ser amigas sin necesidad de esfuerzos, porque aunque nos separen años y puntos de vista, me habéis dado buenos consejos, que no siempre he seguido, y habéis recogido y pegado los trozos sin reproches después de cada golpe. Sabéis que os quiero y que con una charla en el sofá hasta altas horas de la madrugada, o una noche de fiesta lunera una vez al año, tenemos suficiente para seguir queriéndonos siempre.

Doy las gracias por la gran familia que tengo, siempre unida, en las buenas pero sobre todo en las malas. Sabéis que sois demasiados para nombraros uno a uno, pero con todos y cada uno de vosotros he descubierto la felicidad que ofrece un verdadero hogar. A mi madre y a mi padre, no sólo por criarme y aconsejarme, sino por sacrificar vuestras vidas para que vuestros hijos pudiésemos cumplir nuestros sueños, aún a expensas de los vuestros propios. Por alegraros con cada uno de nuestros logros y sufrir con cada una de nuestras caídas. Ahora os entiendo un poco mejor. Sois los mejores padres que un hijo podría tener. A mis hermanos Álex y Lucía, porque gracias a ellos aprendí a compartir y a querer sin medida, a consolar y a pedir perdón. Os doy las gracias por la maravillosa portada de esta tesis, que no hace más que reflejar la impagable ayuda que siempre estáis dispuestos a brindarme.

Sois la energía que me ha permitido correr durante este camino, el aliento y las renovadas fuerzas en cada parada.

Y por último a ti, Óscar. Gracias por hacerme tan inmensamente feliz ese pequeño ratito que pasamos juntos cada día. Gracias por la nueva familia que me has regalado, sobrinos adorables, tardes de domingo en Xallas y una suegra que no da besos, pero me ha hecho mucha compañía cuando más lo necesitaba. Gracias por ser la calma y la despreocupación que contrarrestan mi constante deseo de controlarlo todo. Porque me convences cada vez, de que se pueden unir el medio limón y la media naranja, de que no hay felicidad sin sacrificio. Por no querer ser príncipe azul, sino mecánico, para reparar las averías que sabes que irán apareciendo durante el viaje. Contigo he pasado lo mejor y lo peor de mi vida, y por eso sé que serás el motor que me impulsará cada día para alcanzar todos mis sueños.

Muchas gracias a todos. Espero que podáis sentirnos orgullosos de mi.



# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ÍNDICE</b>  | <b>3</b>  |
| <b>ABREVIATURAS</b>  | <b>5</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | <b>11</b> |
| <b>1. CONCEPTO DE ENVEJECIMIENTO</b>                                     | <b>11</b> |
| <b>2. MECANISMOS DEL ENVEJECIMIENTO</b>                                  | <b>14</b> |
| INESTABILIDAD GENÓMICA   | 15        |
| ACORTAMIENTO TELOMÉRICO  | 19        |
| MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS  | 22        |
| PÉRDIDA DE LA HOMEOSTASIS PROTEICA                                       | 33        |
| DESREGULACIÓN DE LA DETECCIÓN DE NUTRIENTES                              | 35        |
| DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL  | 38        |
| SENESCENCIA CELULAR  | 40        |
| EXTENUACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE   | 43        |
| ALTERACIONES DE LA COMUNICACIÓN INTRACELULAR                             | 45        |
| <b>3. TEORÍAS SOBRE EL ENVEJECIMIENTO</b>                                | <b>47</b> |
| <b>4. MEDICIÓN DEL ENVEJECIMIENTO COMO PROCESO BIOLÓGICO</b>             | <b>48</b> |
| DELECCIONES MITOCONDRIALES   | 51        |
| RACEMIZACIÓN DEL ÁCIDO ASPÁRTICO   | 54        |
| PRODUCTOS DE GLICOSILACIÓN AVANZADA                                      | 55        |
| SISTEMAS DE PUNTUACIÓN OSEOGRÁFICOS                                      | 57        |
| LONGITUD DE LOS TELÓMEROS  | 59        |
| METILACIÓN DEL ADN   | 62        |
| ACTIVIDAD B-GALACTOSIDASA  | 65        |
| <b>5. EL ENVEJECIMIENTO EN LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS</b>               | <b>66</b> |
| ENVEJECIMIENTO EN LA ARTROSIS  | 67        |
| ENVEJECIMIENTO EN LA ARTRITIS REUMATOIDE                                 | 72        |
| <b>OBJETIVOS</b>   | <b>81</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | <b>85</b> |
| <b>1. COLECCIONES DE MUESTRAS</b>  | <b>85</b> |
| COLECCIONES DE MUESTRAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA DMAM DE 8CpGs         | 85        |
| COLECCIÓN DE MUESTRAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE ARTROSIS            | 86        |
| COLECCIÓN DE MUESTRAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE ARTRITIS REUMATOIDE | 89        |
| <b>2. MÉTODOS EXPERIMENTALES</b>   | <b>91</b> |
| ENSAYO DE METILACIÓN DE ADN MEDIANTE MS-SNUPE                            | 91        |
| MEDICIÓN DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS                                 | 94        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b>   | <b>95</b>  |
| ESTIMACIÓN DE LA EDAD BIOLÓGICA BASADA EN 8 SITIOS CPG                           | 95         |
| ANÁLISIS DEL RELOJ BIOLÓGICO BASADO EN LA METILACIÓN DEL ADN                     | 96         |
| ESTIMACIÓN DEL ACORTAMIENTO TELOMÉRICO   | 97         |
| ANÁLISIS DE LA MORTALIDAD EN LA AR   | 98         |
| <b>RESULTADOS</b>  | <b>101</b> |
| <b>1. PREDICCIÓN DE EDAD BIOLÓGICA MEDIANTE 8 SITIOS CPG</b>                     | <b>101</b> |
| <b>2. ESTUDIO DE ENVEJECIMIENTO CELULAR EN PACIENTES CON ARTROSIS</b>            | <b>107</b> |
| RELOJ BIOLÓGICO DE METILACIÓN EN PACIENTES CON ARTROSIS                          | 107        |
| ACORTAMIENTO TELOMÉRICO EN PACIENTES CON ARTROSIS                                | 112        |
| <b>3. ESTUDIO DE ENVEJECIMIENTO CELULAR EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE</b> | <b>114</b> |
| RELOJ BIOLÓGICO DE METILACIÓN EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE               | 114        |
| ACORTAMIENTO TELOMÉRICO EN LA ARTRITIS REUMATOIDE                                | 117        |
| ESTUDIO DE MORTALIDAD EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE                       | 119        |
| <b>DISCUSIÓN</b>   | <b>123</b> |
| <b>PREDICCIÓN DE EDAD BIOLÓGICA MEDIANTE 8 SITIOS CPG</b>                        | <b>123</b> |
| <b>ESTUDIO DE ENVEJECIMIENTO CELULAR EN PACIENTES CON ARTROSIS</b>               | <b>127</b> |
| <b>ESTUDIO DE ENVEJECIMIENTO CELULAR EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE</b>    | <b>134</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>  | <b>143</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>  | <b>147</b> |
| <b>ANEXOS</b>  | <b>183</b> |
| <b>ANEXO 1</b>   | <b>185</b> |
| <b>ANEXO 2</b>   | <b>193</b> |

## ABREVIATURAS

|          |   |
|----------|---|
| AAR      | racemización del ácido aspártico                      |
| ADN      | ácido desoxirribonucleico                             |
| ADNmit   | ADN mitocondrial                                      |
| AGEs     | productos de glicosilación avanzada                   |
| AMP      | adenosina monofosfato                                 |
| AMPc     | adenosina monofosfato cíclica                         |
| AMPK     | proteína quinasa activada por adenosina monofosfato   |
| ANCOVA   | análisis de la covarianza                             |
| Anti-CCP | anticuerpos anti péptidos citrulinados                |
| APTX     | aprtaxina   |
| AR       | artritis reumatoide                                   |
| ARN      | ácido ribonucleico                                    |
| ARNInc   | ARN largo no codificante                              |
| ARNnc    | ARN no codificante                                    |
| AT       | ataxia telangiectasia                                 |
| ATLD     | síndrome similar a ataxia telangiectasia              |
| ATP      | adenosina trifosfato                                  |
| BER      | reparación de bases escindidas                        |
| CDK      | quinasa dependiente de ciclina                        |
| CDKN2A   | inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina        |
| COFS     | síndrome cerebro-óculo-facio-esquelético              |
| CpG      | dinucleótido citosina-guanina                         |
| CREB     | proteína de unión a elementos de respuesta AMPc       |
| DmAM     | medida de edad basada en metilación                   |
| DMRs     | regiones diferencialmente metiladas                   |
| DNMT     | metiltransferasa                                      |
| ERK      | quinasa regulada por señal extracelular               |
| EZH2     | metiltransferasas de lisina de histonas               |
| FOXO     | proteína <i>forkhead box</i>                          |
| FR       | factor reumatoide                                     |
| GC       | cromatografía de gases                                |
| GC-MS    | cromatografía de gases y espectrometría de masas      |
| GG-NER   | reparación de nucleótidos escindidos de genoma global |
| GH       | hormona de crecimiento                                |
| HAT      | acetiltransferasas                                    |
| HDAC     | desacetilasas de histonas                             |
| HGP      | progeria Hutchinson-Gilford                           |

---

## ABREVIATURAS

---

|                |   |
|----------------|---|
| HLA            | antígeno leucocitario humano                                    |
| HPLC           | cromatografía líquida de alta resolución                        |
| HR             | recombinación homóloga  |
| HSR            | respuesta a estrés térmico                                      |
| IC             | intervalo de confianza  |
| IGF            | factor de crecimiento insulínico                                |
| IL             | interleucina  |
| INF- $\gamma$  | interferón gamma  |
| LC-MS          | cromatografía líquida y espectrometría de masas                 |
| MAD            | desviación absoluta media                                       |
| MeCP           | proteínas de unión a metil-citosina                             |
| MGMT           | metilguanina ADN metiltransferasa                               |
| MMP            | metaloproteinasa  |
| MMR            | reparación de errores de emparejamiento de bases                |
| Ms-SNuPE       | extensión de un nucleótido sensible a metilación                |
| mTOR           | diana de la rampamicina de mamíferos                            |
| MTX            | metotrexato   |
| N              | tamaño muestral   |
| NAD            | nicotinamida adenina dinucleótido                               |
| NBS            | síndrome Nijmegen   |
| NER            | reparación de nucleótidos escindidos                            |
| NF-KB          | factor nuclear de las cadenas ligeras kappa de las células B    |
| NHEJ           | recombinación no homóloga                                       |
| NK             | células asesinas naturales                                      |
| OA             | artrosis  |
| OP             | osteoporosis  |
| OSS            | sistema de puntuación oseográfico                               |
| PARP           | proteína polimerasa poli ADP ribosa                             |
| PcG            | proteína de grupos Polycomb                                     |
| PGC-1 $\alpha$ | receptor de proliferación coactivador de peroxisomas 1 $\alpha$ |
| PGE2           | prostaglandina 2  |
| PI3K           | fosfoinositol 3 quinasa   |
| PKB            | proteína quinasa B  |
| PTEN           | fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa                 |
| QDMRs          | regiones diferencialmente metiladas cuantitativamente           |
| RE             | retículo endoplasmático   |
| ROS            | especies reactivas del oxígeno                                  |
| SASP           | fenotipo secretor asociado a senescencia                        |
| SD             | desviación standard   |

---

## ABREVIATURAS

---

|        |   |
|--------|---|
| SNP    | polimorfismo de un solo nucleótido                            |
| SSBR   | reparación de roturas de hebra simple                         |
| T/S    | ratio telómero vs gen de copia única                          |
| TC-NER | reparación de nucleótidos escindidos acoplado a transcripción |
| TDP1   | tiroxil-ADN fosfodiesterasa 1                                 |
| TNF    | factor de necrosis tumoral                                    |
| TRF    | factor de unión a repetición telomérica                       |
| TTD    | tricodistrofia  |
| UPR    | respuesta a proteínas mal plegadas                            |
| UV     | ultravioleta  |
| UVSS   | síndrome de sensibilidad a luz ultravioleta                   |
| VEGF   | factor de crecimiento endotelial vascular                     |
| WRN    | helicasa Werner   |
| WS     | síndrome Werner   |





# INTRODUCCIÓN

## 1. Concepto de envejecimiento

El envejecimiento se define como una disminución de la funcionalidad a lo largo del tiempo que afecta a la gran mayoría de organismos vivos. Es un proceso extremadamente complejo que tiene lugar a nivel sistémico pero que puede mostrar grandes diferencias entre tejidos o tipos celulares del mismo individuo. Por ello, es necesario diferenciar en los organismos pluricelulares un envejecimiento celular y un envejecimiento del individuo en su conjunto o también conocido como envejecimiento organismal [1], [2].

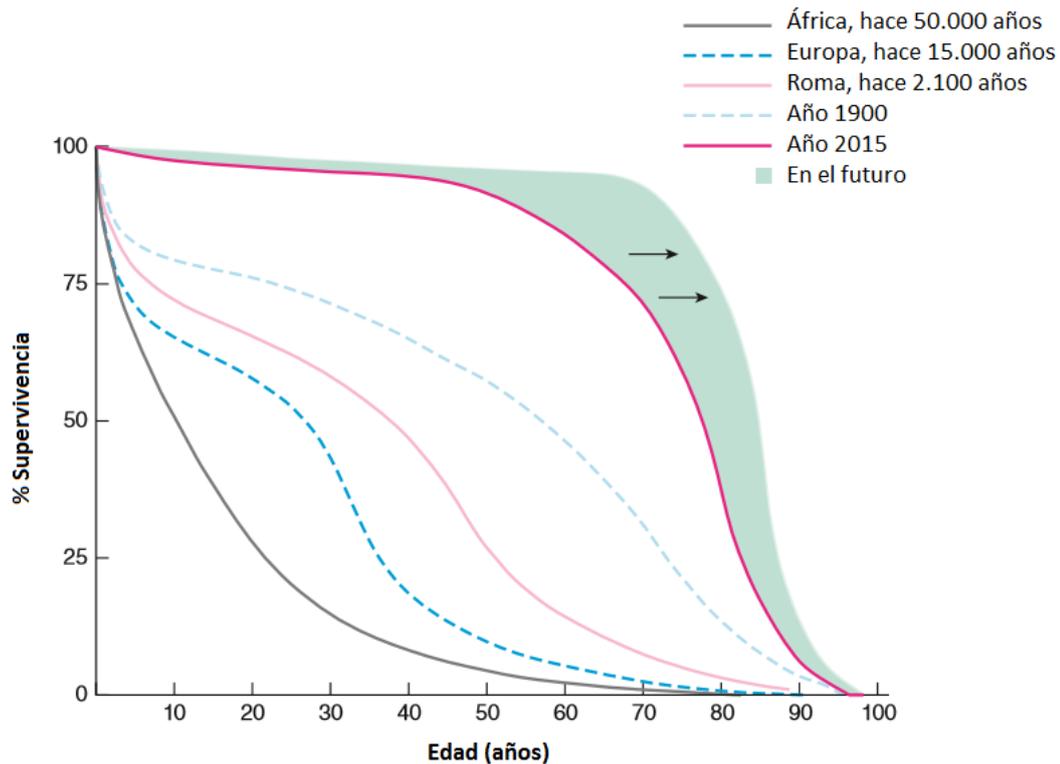
August Weismann, biólogo evolucionista, utilizó una aproximación racional en 1881 para explicar la muerte, proponiendo como causa el desgaste que sufren los tejidos y su capacidad de renovación limitada. Asimismo, observó que durante la evolución los organismos multicelulares inmortales gradualmente fueron evolucionando hacia organismos mortales [3]. Dentro de los organismos inmortales se encuentran las colonias de organismos unicelulares que cooperan entre si. En estas colonias cada célula se divide de forma independiente mediante mitosis y da lugar a dos células idénticas. Sin embargo, en los organismos realmente pluricelulares las células se especializan para llevar a cabo las diferentes funciones, tróficas, defensivas y reproductoras, siendo estas últimas células las únicas con una capacidad ilimitada de dividirse. Así, el coste de una diferenciación en el soma y por tanto una especialización de las células, es el envejecimiento, en contraposición a la indeterminación y la capacidad de renovación infinita de la línea germinal [4], [5].

Shtefko y Rokhlin definen la edad biológica como el ritmo de crecimiento, desarrollo, maduración y envejecimiento característico de cada individuo, como medida que refleja la esperanza de vida individual, condicionada tanto por el componente genético como por las condiciones ambientales a las que está expuesto cada sujeto. Mientras el envejecimiento atendiendo a la edad cronológica hace

referencia siempre a una medida global del organismo, el envejecimiento biológico se aplica tanto a nivel del individuo como específicamente a cada órgano o tejido del mismo. A nivel de individuo refleja la diferencia en esperanza de vida y capacidad funcional en relación con su población de referencia medida mediante biomarcadores que cambian con la edad. Luego, si un individuo muestra una desviación en los biomarcadores hacia los típicos de edades más avanzadas, se considera que tiene una edad biológica mayor que la que le corresponde y una menor esperanza de vida. Por el contrario, si los biomarcadores corresponden en su población de referencia a más jóvenes, indican una menor edad biológica que la cronológica. Por otra parte, como la exposición y acumulación de daños y la expresión de los diferentes genes son mecanismos tejido específicos, puede haber diferencias en como se afecta la capacidad funcional de los diferentes tejidos y tipos celulares dentro del mismo individuo. Por eso, tiene sentido considerar la edad biológica también al nivel específico de diferentes tejidos. Otra característica importante de este concepto de edad biológica es que su interpretación es variable según los biomarcadores utilizados para determinarla. Como hay biomarcadores con diferente sensibilidad a los cambios que se producen en las células y en el organismo, y existen diferentes cambios relacionados con el envejecimiento, no todos los biomarcadores son igualmente informativos y, en ocasiones, pueden proporcionar información discordante[6].

El interés en la edad biológica y la posibilidad de conocerla y modificarla es evidente. Además, se ha reforzado con el gran incremento en la esperanza de vida experimentado en el último siglo y que se ha acompañado de un aumento de la incidencia y repercusión de algunas enfermedades entre las que destacan las enfermedades degenerativas (como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson), inflamatorias (como algunas de las enfermedades reumáticas) y el cáncer [7], [8] (Figura 1).

Los factores que afectan a la edad biológica son tanto propios del individuo, incluyendo los factores genéticos y psicológicos, como de su experiencia vital en la que inciden factores demográficos, exposiciones a factores ambientales, enfermedades, nutrición y desarrollo.



**Figura 1. Cambios en la esperanza de vida del ser humano a lo largo del tiempo.** Los cambios ambientales, en la dieta y los cuidados médicos han incrementado la longevidad del ser humano, sobre todo en los últimos 200 años. Modificado de *Aunan y col.* [8].

En cuanto a las características genéticas, diferentes estudios han puesto de manifiesto la asociación entre distintas enfermedades asociadas con el envejecimiento y los principales genes implicados en los procesos de senescencia e inflamación [9]. Sin embargo, la acumulación de daños debido a los factores ambientales externos sigue siendo la explicación principal a los cambios producidos durante el envejecimiento, relegando la importancia genética a la eficiencia de los mecanismos de reparación de estos daños [10]. Un caso aparte son los síndromes de envejecimiento acelerado

debido a mutaciones de transmisión mendeliana, como la progeria de Hutchinson-Gilford y el síndrome de Werner.

Por lo tanto, el envejecimiento y el conocimiento en profundidad de sus mecanismos reguladores constituyen un reto para la investigación biomédica debido a su implicación en distintas enfermedades, entre ellas en enfermedades reumáticas como la artrosis y la artritis reumatoide.

## 2. Mecanismos del envejecimiento

Desde que Hayflic descubrió en 1965 que los fibroblastos en cultivo tenían un número limitado de divisiones dependiente de la edad del individuo del que provenían [11], [12], los científicos han tratado de utilizar los conocimientos adquiridos estudiando el envejecimiento celular para encontrar tratamientos para enfermedades degenerativas [13], [14]. En los años 1990, se relacionó el número de divisiones de los fibroblastos y otras células en cultivo con el acortamiento de los telómeros atribuyendo un papel central a este mecanismo en el envejecimiento. El acortamiento de los telómeros se debe a la ausencia de la enzima telomerasa en las células somáticas diferenciadas. En apoyo al papel del acortamiento telomérico hay múltiples evidencias. Una de las más intrigantes es la identificación de organismos multicelulares que pueden dividirse de forma indefinida y que no envejecen como las langostas o la medusa *Turritopsis nutricula*. Sus células somáticas tienen una capacidad ilimitada de dividirse y mantienen la expresión de la enzima telomerasa. Sin embargo, se sabe que además del acortamiento de la longitud de los telómeros hay cambios a otros niveles que conducen al envejecimiento de la célula [13], [14]. Estos cambios se han agrupado en nueve mecanismos que se pueden agrupar en tres categorías: los cambios causales de daño (inestabilidad genómica, acortamiento telomérico, modificaciones epigenéticas y pérdida de la homeostasis proteica), los producidos como respuesta a estos daños (desregulación de la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial y senescencia celular) y los que son características definitorias del fenotipo (extenuación de las células madre y alteraciones en la comunicación celular) (Figura 2).

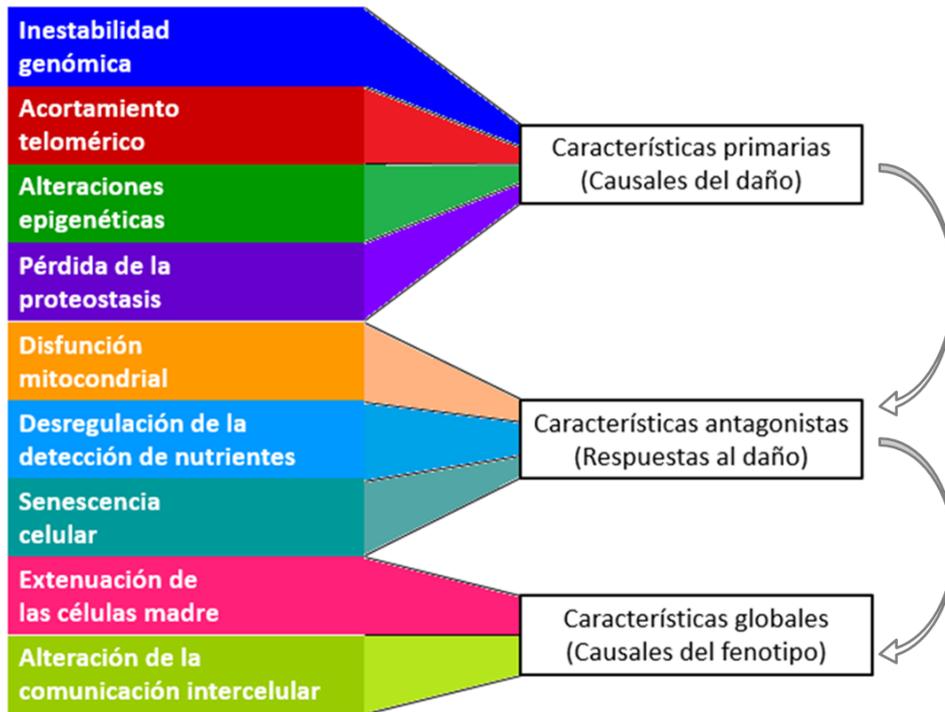


Figura 2. Resumen de mecanismos del envejecimiento y su agrupación en tres categorías funcionales. Modificado de López-Otín y col. [7].

### Inestabilidad genómica

La inestabilidad genómica se define como una tendencia progresiva del genoma a adquirir mutaciones, sobre todo aquellas a gran escala como duplicaciones, deleciones o reorganizaciones cromosómicas visibles en el cariotipo de la célula que las presenta. Esta acumulación de daño en el material genético a lo largo del tiempo se produce como consecuencia de su constante exposición a agresiones endógenas como las especies reactivas del oxígeno (ROS) y exógenas como la radiación ultravioleta. Dentro de la inestabilidad genómica no solo se consideran los daños en el genoma nuclear, sino también el incorrecto funcionamiento de los sistemas de reparación de los mismos y la pérdida de la arquitectura de la lámina nuclear. Además, la inestabilidad genómica también incluye el acortamiento telomérico y el daño del ADN mitocondrial que serán tratados en los siguientes apartados debido a su especial relevancia en el proceso de envejecimiento.

Aunque las células presentan mecanismos de reparación y puntos de control para mitigar el alcance de los daños (Tabla 1), existen evidencias de que la inestabilidad genómica contribuye al envejecimiento celular [15]–[17]. La acumulación de daños en el genoma nuclear, se mencionó por primera vez como causa de envejecimiento a mediados del siglo XX [18]. Estudios posteriores demostraron que la acumulación de mutaciones tiene lugar de forma paralela al envejecimiento y que reducen la capacidad proliferativa de los tejidos [19], [20]. Dentro de los diferentes tipos de mutaciones, las roturas de la hebra de ADN son la principal causa de inestabilidad genómica debido a la elevada tasa de ocurrencia, a la elevada gravedad que conllevan sus daños y la menor fidelidad de los sistemas de reparación de las mismas [21].

Las roturas de cadena sencilla se han visto asociadas con la senescencia en células epiteliales debido a una disminución de la expresión y de la actividad de la proteína polimerasa poli ADP ribosa (PARP). Esta proteína es necesaria para el correcto funcionamiento del sistema de reparación de este tipo de lesiones. Los daños de este tipo desencadenan la activación la ruta de señalización de p16 de arresto del ciclo celular [22]. Estos hallazgos son congruentes con las enfermedades degenerativas que se producen en pacientes con mutaciones en proteínas del sistema de reparación de rotura de hebra simple (SSBR) como la tiroxil-ADN fosfodiesterasa 1 (TDP1) y la aprataxina (APTX) [23], [24].

| Tipo de daño   | Sistema de reparación                                       | Fuente de daño                           | Enfermedad relacionada   |
|--|---|--|--|
| Metilación Guanina O <sup>6</sup> o N <sup>7</sup>             | Reparación directa (MGMT)                                   | Especies reactivas del oxígeno (ROS)     |  |
| Aductos de ADN y proteínas o dímeros de pirimidinas            | Reparación de nucleótidos escindidos (NER): GG-NER y TC-NER | Radiación ultravioleta                   | Tricodistrofia (TTD)<br>S. de sensibilidad a UV (UVSS)<br>S. cerebro-oculo-facio-esquelético (COFS)<br>S. Cockayne |
| Oxidaciones (8oxoG), sitios abásicos                           | Reparación de bases escindidas (BER)                        | ROS                                      |  |
| Roturas peptídicas, sitios 3' fosfoglicolato, 5'OH, sitios AMP | Reparación de roturas de hebra simples (SSBR)               | Radiación ionizante, ROS                 |  |
| Bases incorrectamente emparejadas                              | Reparación de errores de emparejamiento de bases (MMR)      | Errores en la replicación                |  |
| Rotura de doble cadena   | Recombinación homóloga (HR)                                 | Radiación ionizantes, ROS                | Ataxia telangiectasia (AT)<br>S. Similar a Ataxia telangiectasia (ATLD)<br>S. Nijmegen (NBS)<br>S. Werner (WS)     |
|  | Recombinación no homóloga (NHEJ)                            | Radiación ionizantes, ROS, quimioterapia |  |

**Tabla 1. Principales daños en el ADN, sistemas de reparación de los mismos, causas más comunes y enfermedades que ocasionan.** AMP = adenosina monofosfato; MGMT = O<sup>6</sup>-metilguanina DNA metiltransferasa; GG-NER = reparación de nucleótidos escindidos en el genoma global; TC-NER = reparación de nucleótidos escindidos acoplado a transcripción. Basado en *Helleday y col.* [25]

Por otra parte, las roturas de doble cadena ocurren de forma natural durante la meiosis y la recombinación programada del genoma. Gracias a estos procesos se

genera la enorme diversidad de los gametos y de los anticuerpos y receptores de los linfocitos T. No obstante, las roturas de doble cadena que se producen fuera de estos procesos programados son las principales responsables de las translocaciones y deleciones de grandes regiones de ADN que se producen cuando los sistemas de reparación no son eficaces, y que contribuyen de forma significativa al envejecimiento celular [19]. La radiación y los fármacos anticancerígenos son la fuente exógena más común de este tipo de lesiones. También se puede producir un gran aumento de las roturas de doble cadena por mutación en una o varias de las proteínas del sistema de reparación. Cuando es así, se observan enfermedades con características de envejecimiento prematuro (progeroides) que se asocian con un incremento en la susceptibilidad al cáncer. Entre estas enfermedades están las que afectan a varias helicasas RECQ, como los síndromes de Bloom, de Rothmund-Thomson y de Werner, y las que afectan al sistema de reparación de roturas de la doble cadena de ADN, como la ataxia telangiectasia [26]–[31] (Tabla 1).

Los sistemas de reparación de daños en el ADN contribuyen a mantener la integridad del genoma para permitir el correcto funcionamiento de la célula y su división (Tabla 1). La acumulación de mutaciones en los genes implicados en estos mecanismos de reparación da lugar a una disminución de su eficiencia a medida que la célula envejece [32]. Para evitar la proliferación de células aberrantes, existen puntos de control en las distintas fases del ciclo celular que permiten su arresto en caso de detectarse daños irreparables en el material genético. La proteína p53 juega un papel central en la eliminación de estas células aberrantes mediante el sistema inmune o mediante su transformación en células senescentes, incapaces de proliferar [33], [34].

Además, la inestabilidad genómica puede estar producida por mutaciones en las proteínas de la lámina nuclear, que desempeñan un papel fundamental en la organización espacial y temporal del material genético [35]. Entre ellas destaca la lamina tipo A que es un componente estructural que mantiene la arquitectura de la cromatina. Alteraciones en esta proteína producen daños a nivel replicativo, transcripcional y de reparación y silenciamiento del ADN [36]. Mutaciones en el gen

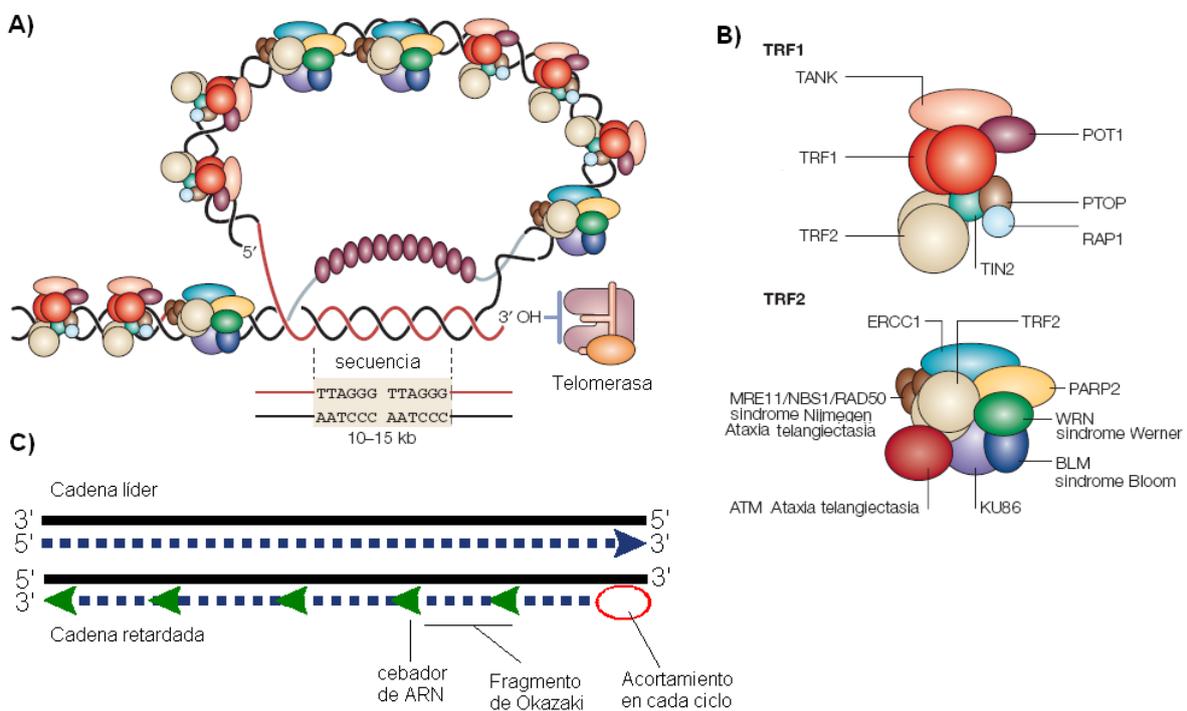
de lamina tipo A causan la progeria de Hutchinson-Gilford (HGP), que es el síndrome de envejecimiento prematuro más característico, y el síndrome de dermatopatía restrictiva letal [37].

También hay estudios que indican la posibilidad de que en pacientes con AR o con artrosis haya un aumento de la inestabilidad cromosómica. Así se ha comunicado que los pacientes con artritis reumatoide presentan niveles elevados de roturas de la doble cadena del ADN en comparación con controles sanos en distintas subpoblaciones de células sanguíneas como los polimorfonucleares, y las células CD4<sup>+</sup> tanto naïve como memoria [38]. Esta acumulación de daños se ha asociado con defectos en los sistemas de reparación del ADN y niveles bajos de la enzima quinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM), necesaria para la reparación de roturas en la doble hebra de ADN [39]. Por su parte, se han encontrado incrementadas las aberraciones cromosómicas, especialmente las trisomías y tetrasomías, en los condrocitos de 33 pacientes con artrosis de rodilla y cadera comparados con los condrocitos procedentes de la cabeza femoral de 20 controles [40]. Sin embargo, algunos de estos hallazgos han sido obtenidos con técnicas indirectas [37], la disminución en ATM no ha sido estudiada por grupos de investigación diferentes del que la describió [38], y las aberraciones cromosómicas descritas en la artrosis, se han observado en lesiones avanzadas, por lo que no está claro si representan el daño acumulado por el tejido o forman parte de los mecanismos patogénicos [39]. Luego la relevancia de estos hallazgos no está clara, y aunque permiten proponer la hipótesis de su participación en un posible envejecimiento acelerado en la AR y en la artrosis, no la demuestran.

### **Acortamiento telomérico**

Los telómeros son estructuras especiales de cromatina formadas por repeticiones en tándem de la secuencia TTAGGG que alcanzan 10 a 15 kb de longitud en humanos. A esta secuencia se unen proteínas específicas que protegen los extremos de los cromosomas de la degradación enzimática y de la acción de los sistemas de reparación de roturas del ADN (Figura 3A y B). Debido al sistema de

duplicación de ADN, los telómeros se acortan en cada ciclo de división celular (Figura 3C). Este acortamiento progresivo conlleva el fin de la replicación natural de las células somáticas tras un cierto número de divisiones, conocido como límite de Hayflick. La replicación de la cadena retardada del ADN necesita de la creación de un cebador de ARN que, a medida que avanza la horquilla de replicación, se substituye por ADN. Sin embargo, en el extremo de la hebra este fragmento de ARN no puede ser reemplazado debido a la ausencia de un nucleótido cebador con un extremo 3'OH libre. De esta forma, el telómero se acorta en 50 a 150 bases en cada ciclo de división según el tipo celular. Este fenómeno conduce al arresto del ciclo celular por la imposibilidad de superar los puntos de control de la fase S y la célula deja de dividirse [1]. Sin embargo, las células que expresan el gen *Tert* que codifica para la enzima telomerasa pueden mantener la longitud de los telómeros a lo largo de las sucesivas divisiones debido a la capacidad de esta enzima de alargar el extremo 3'OH sin necesidad de cebador [41], [42].



**Figura 3. Estructura y dinámica de los telómeros.** A) Secuencia y estructura en bucle del extremo de un cromosoma. B) Complejos proteicos de unión a la región telomérica y enfermedades relacionadas con el envejecimiento asociadas con mutaciones en las

proteínas que los conforman. C) Esquema que muestra el problema de finalización de la replicación: al eliminarse el último cebador de ARN de la cadena retardada existe un fragmento que la polimerasa no puede extender debido a la falta de un 3'OH libre. Adaptado de *Blasco y col.* [43].

La importancia de la longitud de los telómeros en el envejecimiento está sobradamente demostrada mediante diversos modelos murinos con acortamiento o alargamiento de estas secuencias que presentan una disminución o un aumento de la vida respectivamente [44]–[46]. Además, algunos estudios han encontrado relación entre el acortamiento de los telómeros y un incremento del riesgo de mortalidad en humanos [47], [48]. Sin embargo, el hallazgo más concluyente es la posibilidad de revertir el envejecimiento prematuro en modelos de ratón deficientes en telomerasa y retrasar el envejecimiento normal en estos ratones mediante la reactivación o la transducción viral sistémica de esta enzima, lo que además no implica un incremento en la tumorigénesis [13], [49].

Entre las proteínas de unión a telómeros se encuentran los complejos proteicos TRF1 y TRF2 (por su nombre en inglés *Telomeric Repeat-binding Factor*), que junto a otras proteínas forman la unidad funcional conocida como refugina (de shelterin en inglés), ya que proporciona protección a los telómeros. Estas proteínas se unen a la secuencia repetitiva para protegerla de los sistemas de reparación del ADN y asegurar su estado como heterocromatina silenciada (Figura 4B). Las mutaciones en proteínas de la refugina, así como mutaciones en los genes que codifican la telomerasa, causan algunas formas de disqueratosis congénita, una forma congénita de la anemia aplásica, y algunos casos de fibrosis pulmonar primaria. Estas enfermedades presentan acortamiento acelerado de los telómeros y defectos importantes de la regeneración tisular [50]. El mecanismo implicado se ha estudiado en detalle con modelos murinos deficientes en las distintas proteínas implicadas, en los que se observa envejecimiento prematuro, debido a un mayor acortamiento telomérico [51]–[53] [54].

Aparte de las enfermedades hereditarias, se ha descrito un acortamiento telomérico acelerado en múltiples enfermedades, incluyendo varias enfermedades reumáticas como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjogren, la esclerosis múltiple, la artrosis y la osteoporosis [55]. En relación con la artrosis, se ha observado un mayor acortamiento telomérico en condrocitos de pacientes con artrosis respecto a controles sanos [56], y en el cartílago lesionado en comparación con otras regiones del cartílago distales no lesionadas de los mismos pacientes con artrosis de rodilla [57]. Además, se ha descrito un acortamiento telomérico en células sanguíneas de 160 pacientes con artrosis de mano en comparación con 926 controles sanos [58]. En esos pacientes, la erosión de los telómeros se correlacionó con la severidad de la artrosis [57]. No obstante, estos hallazgos en células sanguíneas no han sido confirmados de forma independiente y se han observado resultados contrarios en un estudio de menor tamaño [40]. Algo parecido ocurre en la artritis reumatoide con las células sanguíneas. Algunos estudios han encontrado un acortamiento telomérico tanto en cromosomas individuales, especialmente en el cromosoma 4, como en poblaciones celulares sanguíneas aisladas, como las células T y los granulocitos de pacientes con AR [59]–[61]. Sin embargo, en otros estudios no se han encontrado diferencias significativas o incluso las células de los pacientes con artritis reumatoide mostraban telómeros más largos que los controles [62], [63]. A diferencia de la artrosis, no se ha realizado ningún estudio en AR que haya estudiado el acortamiento telomérico en células de las articulaciones afectadas.

### **Modificaciones epigenéticas**

Las principales modificaciones epigenéticas son las modificaciones postraduccionales de las histonas, la metilación del ADN y la acción de los ARN no codificantes [64]. Todas ellas contribuyen a modular la organización y función del genoma, lo que se refleja con frecuencia en cambios de expresión génica. Su característica distintiva respecto al genoma es su flexibilidad, y con respecto a otros moduladores, como los factores de transcripción, es la estabilidad. Por lo tanto,

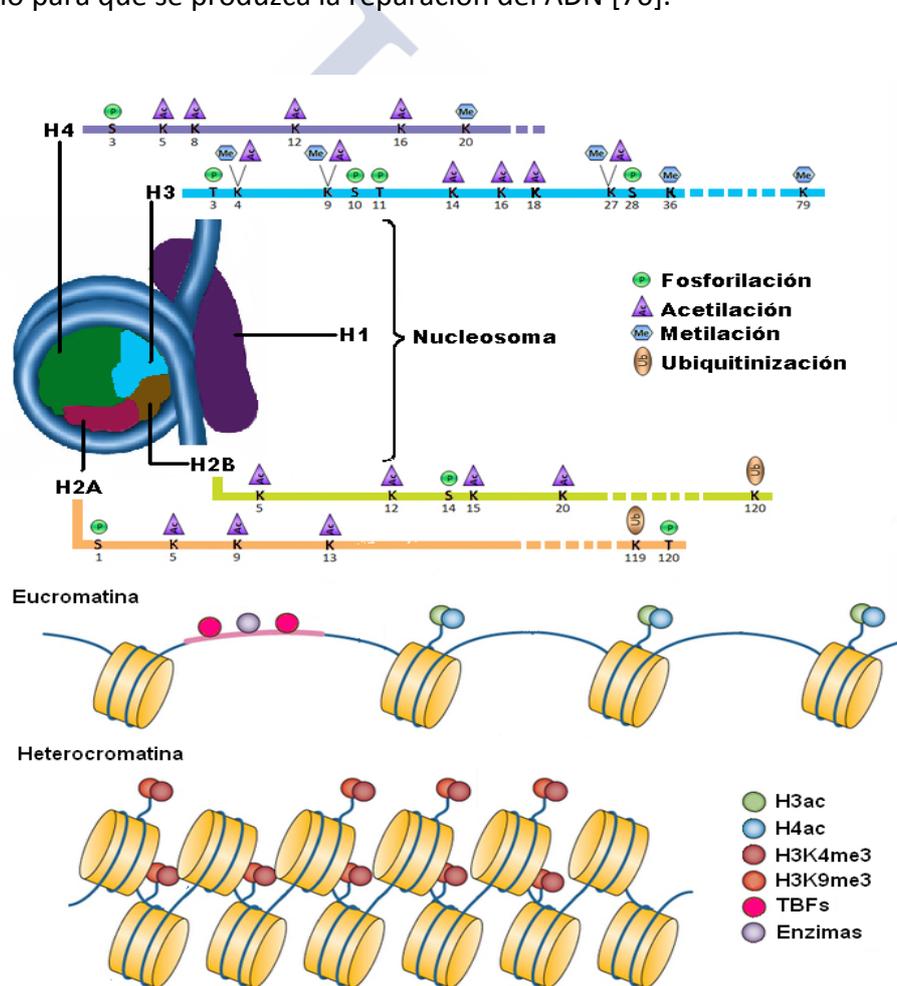
cambian en respuesta a estímulos externos y a la situación del organismo, pero persisten en el tiempo y pueden transmitirse a las células hijas tras la división celular. Por lo tanto, fijan adaptaciones a la situación del organismo y pueden ser útiles como biomarcadores de su estado.

### **Modificaciones postraduccionales de las histonas**

La unidad básica de organización del material genético es el nucleosoma que está compuesto por 147 pares de bases de ADN unidos a un grupo de 8 moléculas de histonas (H2A, H2B, H3 y H4 en pares) y enlazados al siguiente nucleosoma por una secuencia de unos 80 pares de bases. Mediante la unión de la histona H1 y otras proteínas accesorias los nucleosomas alcanzan distinto grado de compactación. De esta forma, la cromatina puede presentarse como heterocromatina altamente condensada o como eucromatina laxa, que muestran niveles de transcripción y exposición a daños muy diferentes [65] (Figura 4).

Varios estudios han mostrado que el envejecimiento se asocia con una disminución en la cantidad de histonas, así como un retraso del envejecimiento por su expresión forzada. Se ha observado una disminución de hasta el 50% de las histonas H3 y H4 en fibroblastos senescentes humanos en comparación con células jóvenes. No obstante, los cambios de estado de la cromatina no dependen solo de la cantidad de histonas sino de sus modificaciones postranscripcionales. Se han descrito más de 60 modificaciones que pueden tener lugar en distintos aminoácidos, y que constituyen auténticas marcas que pueden cambiar a lo largo de la vida del individuo [66] (Figura 4). Estas marcas de las histonas juegan un papel importante en la estructura de la cromatina, permitiendo la unión de diferentes factores de remodelación, y en la transcripción de los genes, modulando la unión de los factores de transcripción y de los complejos de proteínas reguladoras. En relación con el envejecimiento, se ha observado una redistribución y pérdida a nivel global de la heterocromatina [16]. Además, se ha visto que modificaciones en las histonas asociadas con la edad también están implicadas en la pérdida del silenciamiento de los elementos repetitivos procedentes de retrovirus endógenos y de la estabilidad de los cromosomas que se

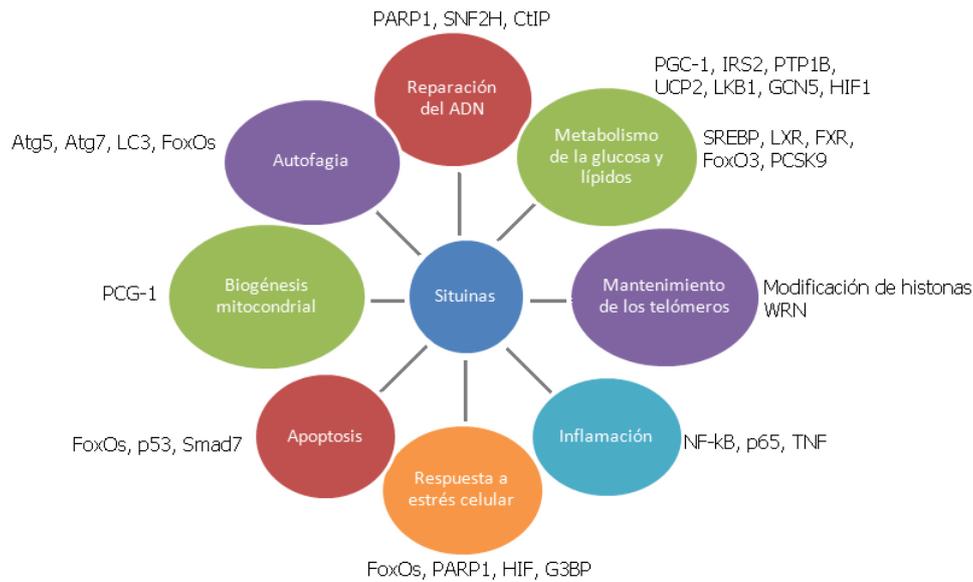
producen en los ancianos. Otro aspecto relacionado es la pérdida de compactación de la heterocromatina en los extremos de los cromosomas debida a cambios en las marcas de las histonas que se asocia de desregulación de la longitud de los telómeros [67], [68]. Las interacciones entre las marcas de las histonas y la estabilidad genómica se completan con los cambios que se producen en estas marcas como consecuencia del daño en el ADN. Así, si se produce una rotura de la doble hebra de ADN, la histona H2AX (que es una de las isoformas de la H2A) se fosforila a lo largo de varias megabases para inhibir la transcripción de la región dañada [69]; y las histonas H2A y H2B se ubiquitinan en una zona extensa de la cromatina circundante como paso necesario para que se produzca la reparación del ADN [70].



**Figura 4. Estructura del nucleosoma, principales modificaciones postraduccionales de las histonas y su relación con los dos estados más comunes de la cromatina. TBFs = *Transcription Binding Factors* = Factores de transcripción, H3ac = acetilación de la**

histona 3, H4ac = acetilación de la histona 4, H3K4me3 = trimetilación de la lisina 4 de la histona 3, H3K9me3 = trimetilación de la lisina 9 de la histona 3.

Las enzimas que modifican a las histonas también se han relacionado con el envejecimiento. Estas enzimas son muy variadas, pero las más estudiadas y que parecen más importantes en relación con el envejecimiento son las que añaden grupos acetilo a las lisinas (acetiltransferasas, HAT), o los eliminan (desacetilasas de histonas, HDAC). Especialmente las sirtuinas, que son un tipo específico de desacetilasas dependientes de NAD, tienen un efecto antienvjecimiento en múltiples modelos animales. Este efecto es muy prominente en los experimentos de restricción calórica en los que hay un aumento de su actividad. Algunas de las funciones de las sirtuinas se relacionan directamente con la deacetilación de histonas, como el silenciamiento y la remodelación de la cromatina o el mantenimiento de la estabilidad de los telómeros, pero otras se deben a deacetilación de otras proteínas entre las que hay muchos factores de transcripción o a su interacción metiltransferasas de histonas. Por varias de estas rutas, las sirtuinas juegan un papel clave en diferentes mecanismos relacionados con el envejecimiento celular y por ello se mencionarán también en los próximos epígrafes (Figura 5). Cuando se producen daños en el ADN, estas enzimas se reubican para inhibir la transcripción y desacetilar las proteínas de los complejos de reparación. Se ha visto que si se incrementa la expresión de las sirtuinas se suprime la transcripción aberrante de genes que deberían estar silenciados y se reducen las enfermedades asociadas al envejecimiento. Entre los resultados más llamativos que muestran su gran influencia se puede destacar el aumento de la longevidad de ratones por sobreexpresión de la sirtuina 1 en el cerebro o el envejecimiento prematuro en ratones deficientes en sirtuina 6 [71].



**Figura 5. Principales rutas implicadas en el envejecimiento sobre las que actúan las sirtuinas.** Basada en *Giblin y col.* [71].

No se han investigado las marcas de las histonas en relación con el envejecimiento en la AR ni en la artrosis, aunque se han caracterizado cambios con la edad en dos de las marcas que regulan la expresión de un factor de transcripción, Nfat1, necesario para el mantenimiento de la homeostasis del cartílago articular en el adulto. El incremento de la expresión de este factor con la edad se debe a la unión de la histona H3K4me2 al promotor de Nfat1, reemplazando a la histona H3K9me2, que lo mantiene silenciado durante el desarrollo [72]. Por otra parte, varios estudios han analizado los cambios que se producen en algunas deacetilasas. Así, por ejemplo, se ha visto que las HDAC y Sirt1 están sobreexpresadas en el tejido sinovial de los pacientes con AR [73]. El TNF es uno de los estímulos que induce esta sobreexpresión. Además, los niveles elevados de HDAC o de Sirt1 contribuyen a la producción de citoquinas inflamatorias, mientras que los inhibidores de HDAC o el silenciamiento de Sirt1 las reducen. Por ello, se ha propuesto que los inhibidores de HDAC pueden ser tratamientos eficaces en la AR [73]. En varios de estos estudios se utilizó sinovia de pacientes con artrosis como comparación y siempre mostró niveles más bajos de HDAC o de Sirt1 que la de los pacientes con AR. Sin embargo, la situación en el cartílago de

los pacientes con artrosis parece que es distinta de la observada en la sinovia. Así, una de las HDAC, HDAC7, está elevada en este tejido y su nivel incrementado se correlaciona con proteínas que participan en el daño como MMP13 [74]. Posiblemente esta es la causa de que los inhibidores de HDAC también produzcan efectos beneficiosos en el cartílago en modelos de artrosis, lo que hace que se consideren también como posibles tratamientos para esta enfermedad. Por su parte, una sirtuina, Sirt6, está disminuida en el cartílago de pacientes con OA y cuando es inducida en el cartílago de ratones protege de OA. La protección está mediada por una disminución de la senescencia celular y por el control de la ruta del NFkB [75].

Por otra parte, otra sirtuina, Sirt3, disminuye en el cartílago con la edad, y esta disminución se asocia con un incremento de la acetilación de las lisinas y disminución de la capacidad antioxidante por reducción de la expresión de la superóxido dismutasa mitocondrial 2 (SOD2) [76]. Estos experimentos que unen evidencias obtenidas en ratas, ratones y tejidos de pacientes, indican que la disminución de Sirt3 con la edad reduce la capacidad de neutralizar la oxidación mitocondrial del cartílago y predispone a la artrosis. Luego en el cartílago parece que se unen aumento de alguna HDAC con disminución de las sirtuinas como factores favorecedores de la OA. Este panorama complejo y la falta de experimentos específicos hacen que no se pueda predecir la repercusión que los cambios observados en HDAC y sirtuinas pueden tener en el envejecimiento celular ni en la AR ni en la OA.

### **Metilación del ADN**

La metilación del ADN es uno de los mecanismos más importantes de regulación del genoma que consiste en la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina de un dinucleótido citosina-fosfato-guanina (CpG). Una parte de estos sitios CpG se localizan en promotores y *enhancers* agrupados en las islas CpG. Para que una región se considere una isla CpG debe tener al menos 500 pares de bases y un 50% de contenido de CG, siendo la ratio de sitios CpG observados y esperados  $\geq 0.6$ . Las islas CpG son frecuentes en los promotores de los genes *housekeeping*, donde están permanentemente desmetiladas; pero también se encuentran en regiones repetitivas

del genoma donde están constantemente metiladas. Parece que la metilación de estas regiones es la responsable de su silenciamiento debido a la pérdida de afinidad de los factores de transcripción y unión de proteínas de represión específicas, llamadas MeCP ("*Methyl-Cytosine binding Protein*") [77]. Sin embargo, también existen sitios CpG que no forman parte de las islas CpG, sino que se encuentran dispersos a lo largo del genoma. La función de estos sitios CpG no está todavía totalmente esclarecida pero su estudio ha cobrado importancia al descubrir que los cambios de metilación de estos sitios están asociados con diferentes condiciones y patologías. Algunos de estos sitios también se asocian con cambios de expresión en genes cercanos o con la procesividad de las polimerasas de ARN.

El estudio de los patrones de metilación de los diferentes tejidos ha dado lugar al conocimiento de las distintas regiones diferencialmente metiladas (DMRs). Recientemente este estudio se ha ampliado al estudio de los cambios cuantitativos de metilación (QDMRs), que permiten distinguir no sólo regiones totalmente metiladas y totalmente desmetiladas, sino también con distintos grados de metilación, lo que ocurre en muchos sitios CpG a lo largo de la vida del individuo [78].

Se ha documentado una disminución en la metilación en los elementos repetitivos del genoma durante el envejecimiento, que se ha propuesto que promueve reordenamientos cromosómicos y eleva la tasa de mutación [79]–[81]. En contraposición se observa un incremento en la metilación de las islas CpG de las regiones promotoras, que conducen a una disminución de la expresión de los genes que regulan, si bien al suponer una menor proporción del genoma frente a las regiones repetitivas se habla siempre de una hipometilación global del ADN con la edad [82], [83]. Estos cambios se han apreciado también en células senescentes y en enfermedades progeroides [84], [85].

Con la aparición de los chips de metilación de Illumina, que permiten analizar 27000 o 450000 sondas a lo largo de todo el genoma, numerosas publicaciones han comunicado un elevado número de cambios en los niveles y localización de la de

metilación genómica asociados con la edad tanto en células sanguíneas como en otros tejidos [83], [86]–[94]. Algunos de estos cambios se han analizado funcionalmente, como es el caso de la hipermetilación del promotor del gen COX7A1 con la edad, que está implicado en el metabolismo de la glucosa, y que está asociada a la diabetes tipo 2 [95]. La deposición de proteína  $\beta$ -amilode en el cerebro también está relacionada con una desmetilación progresiva de su promotor a medida que el individuo envejece. Esta desmetilación también se observa en pacientes con la enfermedad de Alzheimer [96]. Se han considerado también cambios con mayor repercusión como la hipermetilación del ADN ribosomal, lo que daría lugar a una disminución de la síntesis proteica durante el envejecimiento [97]–[99]. En la misma línea, se ha descrito una hipermetilación de los promotores de diferentes factores de transcripción en células madre de distintos tejidos que explicarían en parte la extenuación de las mismas y la pérdida de regeneración tisular durante el envejecimiento [100], [101]. Sin embargo la mayoría de cambios de metilación asociados con el envejecimiento se encuentran en regiones intergénicas y que aparentemente carecen de funcionalidad [102], [103]. Así, el sitio CpG más asociado con la edad en diferentes estudios, el cg16867657 se encuentra en el gen ELOVL2 que codifica para una proteína transmembrana que participa en la elongación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y sin implicación en el envejecimiento conocida [104].

Ante la falta de evidencias sobre el mecanismo específico por el cual tienen lugar cambios de metilación con la edad, se ha propuesto un modelo de deriva epigenética. Según este modelo, los niveles de metilación específicos de cada sitio CpG se modifican al azar por insuficiente exactitud del sistema de mantenimiento y los cambios se acumulan con el paso del tiempo [105]. De esta forma, los sitios CpG que están metilados en la juventud tenderían a desmetilarse con el paso del tiempo y ocurriría lo contrario con los sitios que presentan niveles de metilación bajos en edades tempranas. Estos cambios se añaden a los que ocurren por otras razones ya que aunque los patrones de metilación de las células somáticas son generalmente estables y heredables a través de las divisiones celulares, incluso de manera completa como ocurre en las células germinales. A medida que las células se diferencian

adquieren los patrones característicos de cada tejido a la par que se producen otros cambios en la metilación en respuesta a circunstancias del individuo o a exposiciones ambientales. Todos estos cambios se van produciendo por la maquinaria de metilación y desmetilación del ADN, cuyos errores se incrementan en las células neoplásicas y durante el envejecimiento [106]. Los mecanismos de control de la metilación incluyen metiltransferasas de mantenimiento (DNMT1), que copian el patrón de la hebra madre en la hija durante la división celular, y de metilación *de novo* (DNMT3A y B) que añaden nuevos sitios metilados. Además, estas metiltransferasas interactúan con las HDAC para actuar conjuntamente en la represión transcripcional. Las desmetilaciones pueden tener lugar por la simple falta de mantenimiento en los procesos de metilación o por desmetilación activa mediante las enzimas TET que oxidan la 5-metilcitosina a 5-hidroximetil citosina [107].

Aunque se sospecha que los cambios de metilación del ADN tienen un papel importante en la patogenia de la artrosis y de la AR, todavía no se han estudiado con detalle. Así se han descrito patrones de metilación que diferencian a los sinoviocitos de pacientes con AR de los controles, incluyendo una hipometilación global [108]. También se ha visto que hay cambios en los linfocitos T CD4 naïve de los pacientes con AR y, de forma destacable, que algunos de esos cambios son similares a los observados en los sinoviocitos [108]. Las consecuencias que estos cambios puedan tener en la patogenia de la AR todavía no se conocen, aunque hay algunos que parecen importantes como la hipometilación en el promotor del gen de la IL-6 en las células sanguíneas se asocia con una elevada producción de ARNm de IL-6 en experimentos *in vitro* [109]. Tampoco se ha estudiado si hay alguna relación de los cambios con el envejecimiento o si muestran signos de envejecimiento acelerado. En cuanto a la artrosis, se han descrito algunos SNPs que dan lugar a la aparición de sitios CpG y que están asociados con la susceptibilidad a padecer artrosis, como rs225014 en DIO3 y rs143383 en GDF5. Sin embargo, la mayoría de los cambios en la metilación observados en los condrocitos no son genéticos sino que probablemente son debidos a los mecanismos de adaptación al estrés al que están sometidos a lo largo de la vida del individuo [110]. Varios estudios del metiloma han observado diferencias entre el

patrón de metilación de los condrocitos de los pacientes con OA en comparación con los controles [111]. Sin embargo, todavía no se ha estudiado si los cambios en la metilación asociados con la artrosis tienen relación con la edad de los pacientes, ni si se asocian con envejecimiento acelerado.

### **ARN no codificante**

Recientemente, los ARN no codificantes (ARNnc) han emergido como importantes moléculas reguladoras de la expresión génica. Son ARN que no codifican proteínas y que regulan la expresión a nivel postranscripcional mediante varios mecanismos. El más común consiste en inhibir la traducción a proteínas al unirse de forma complementaria a los transcritos de ARNm [112], [113]. El conocimiento de estos ARNnc y de su función todavía es muy incompleto pero algunos ya se han relacionado con el envejecimiento.

Uno de los ARNnc más claramente relacionados con el envejecimiento hasta ahora es ANRIL que pertenece al grupo de los ARN largos no codificantes (ARNlnc). La secuencia de este ARNlnc se encuentra en el clúster génico INK4A-ARF-INK4B. Una vez expresado, ANRIL regula negativamente la expresión de las proteínas que se codifican en ese mismo clúster. Estas proteínas tienen un papel importante en la senescencia celular, como se comentará más adelante, y por ello ANRIL está implicado en la proliferación y senescencia [114]–[116]. Implicación que se refleja en que el locus se ha asociado en estudios de genoma completo con varias enfermedades características de edad avanzada y, dentro del locus, la expresión de ANRIL es la que mostró la asociación más fuerte con los múltiples fenotipos [117]. Por ello, se piensa que no sólo tiene un papel en el envejecimiento celular sino que alguno de sus alelos acelera el envejecimiento aumentando la susceptibilidad a la enfermedad coronaria o la diabetes tipo 2 entre otras enfermedades. Sin embargo, no se ha encontrado asociación de este locus con AR o con OA. Otros ARNlnc también parecen relacionados con el envejecimiento. Entre ellos, destacan SAL-RNA1, MALAT1 y MIAT que retrasan la senescencia según experimentos en los que se veía que tenían un nivel reducido en células senescentes, y cómo el silenciamiento de cada uno de ellos inducía varias

características del fenotipo senescente [118]. Otros ARNlnc han mostrado expresión diferencial en células senescentes y células jóvenes pero todavía se desconocen los mecanismos de su implicación [115], y de otros se sabe que están involucrados en procesos inducidos por daño en el DNA por lo que también podrían estar relacionados con el envejecimiento [119].

En cuanto a los microARNs, se han descrito numerosos cambios de expresión de los mismos en las distintas etapas de la vida [120]–[122]. La mayoría de estos estudios han analizado muestras de sangre pero no han mostrado resultados consistentes entre sí. Por lo tanto, no es posible todavía definir qué microARNs están asociados con la edad de una forma reproducible aunque algunos se han replicado en, al menos, dos grupos de sujetos como miR-24, -363, -106a, -126, -30d, y -21. Debido al diseño de estos estudios no es posible distinguir si se trata de meros biomarcadores de envejecimiento o si los microARN tienen un papel causal en el envejecimiento y la senescencia. En suero se han encontrado microARNs que son diferentes entre pacientes que han muerto jóvenes o que han llegado a centenarios en muestras obtenidas años antes de la muerte [122]. Estos microARNs podrían tener un papel más directo en el envejecimiento, pero el pequeño tamaño del único estudio con este diseño no permite considerarlo como más que una posibilidad. Una evidencia más directa de la implicación causal de los miRNA en el envejecimiento se ha obtenido gracias al estudio de modelos animales de síndrome de envejecimiento acelerado [123], [124]. Tres de los miRNA identificados en estos estudios son miR-29, -124 y -365. La demostración de su papel causal en el envejecimiento tiene relevancia también en relación con el envejecimiento uniforme de los distintos tejidos del organismo, ya que se ha sugerido que los microARNs podrían explicar este fenómeno [125].

En cuanto a las enfermedades reumáticas, en la artrosis diversos micro-ARN se han relacionado con cambios de expresión en diferentes factores implicados en la patología. Así, miR-146a reprime la expresión del gen de la IL-1 además de estar relacionado con el dolor de los pacientes tanto con artrosis como con artritis reumatoide [126]. Sin embargo, en un array de miR-RNAs solo miR-199a-3p, 193b y

320c, tenían una expresión en cartílago de pacientes con reemplazamiento de rodilla en relación con la edad [127]. En los pacientes de AR también el miR-146a se ha encontrado incrementado en sangre y tejido sinovial y junto con el miR-155 han demostrado ser los miR-RNAs más importantes en la AR. Su implicación en el envejecimiento está todavía sin esclarecer, si bien se ha propuesto que podrían jugar un papel en la regulación de la inflamación [128], [129].

### **Pérdida de la homeostasis proteica**

La homeostasis proteica o proteostasis es el conjunto de rutas biológicas mediante las cuales la célula controla la biogénesis, plegamiento, tráfico y degradación de las proteínas tanto internas como de secreción [130], [131]. Por lo tanto, los mecanismos implicados en la proteostasis son: la maquinaria de traducción ribosomal, el sistema de plegamiento mediado por chaperonas y sobre todo los sistemas de degradación, autofágica, lisosomal y proteasomal. Estos mecanismos de mantenimiento se ven afectados durante procesos de estrés, diferentes enfermedades y durante el envejecimiento [132].

La alteración de la tasa de síntesis proteica es el mecanismo principalmente afectado por la edad. La simple reducción de la tasa de traducción es suficiente para incrementar la longevidad en múltiples especies. Se ha hipotetizado que se deba simplemente a una reducción de la carga sobre la maquinaria de plegamiento y eliminación, que tiende a ser más ineficiente en el organismo envejecido [133]–[135]. Sin embargo también se ha visto que la disminución de la traducción genera una selección de los ARNm que van a ser traducidos favoreciendo la síntesis de determinadas proteínas que están implicadas en el incremento de la longevidad [136].

En cuanto al sistema de plegamiento proteico, el nivel de expresión de las chaperonas se incrementa en respuesta al estrés [137]. Un ejemplo es la respuesta al estrés térmico en *C. Elegans*. Se ha establecido una relación causal entre el incremento de expresión de proteínas del sistema de respuesta a estrés térmico (*Heat stress*

*response, HSR*) y el incremento de la longevidad; mientras que su deficiencia causa envejecimiento prematuro [138]–[140]. También en ratones deficientes en proteínas de este sistema tienen una menor longevidad y fenotipos progeroides exacerbados [141]. Los problemas de plegamiento proteico tienen especial importancia en el retículo endoplasmático (RE) y sobre todo en tipos celulares especializados en la secreción de proteínas por su elevada demanda [142]. Además el RE junto con el sistema de vesículas está relacionado con el tráfico proteico cuyo mal funcionamiento está también ligado al envejecimiento prematuro [143].

Finalmente, para una proteostasis eficiente es fundamental el correcto funcionamiento de los mecanismos de degradación proteica puesto que son el punto final de la ruta que impide la acumulación y agregado de proteínas disfuncionales. El mecanismo principal de degradación de proteínas dañadas o mal plegadas es el proteasoma [144]. Durante el envejecimiento disminuye la expresión de las subunidades proteicas que lo conforman, se desensambla o se inactiva por interacción con agregados proteicos [145]–[147]. Esto genera una acumulación de proteínas disfuncionales que colapsan la célula e inducen su senescencia [148]. Además, fibroblastos tratados con inhibidores de proteasomas presentan una capacidad de división menor y desarrollan un fenotipo senescente [149]. Ratones con deficiencias en diferentes proteínas de este sistema muestran envejecimiento prematuro y una vida más corta [150], [151]. En el caso de proteínas o agregados proteicos de mayor tamaño la degradación y eliminación se produce por el sistema autofágico-lisosomal. Este sistema también se ve afectado por el envejecimiento, con la consiguiente disminución en el número de organelas dañadas que se eliminan y acumulación de la carga no digerida en los lisosomas [152], [153]. Así, numerosas proteínas implicadas en la ruta de la autofagia están disminuidas en los tejidos envejecidos [154].

En general, el sistema de proteostasis está alterado en enfermedades de edad avanzada, como las enfermedades de Parkinson, Alzheimer o Huntington, y en los síndromes progeroides [132], [147]. También se han asociado con algunas de las principales enfermedades reumáticas. La desregulación de la homeostasis proteica en

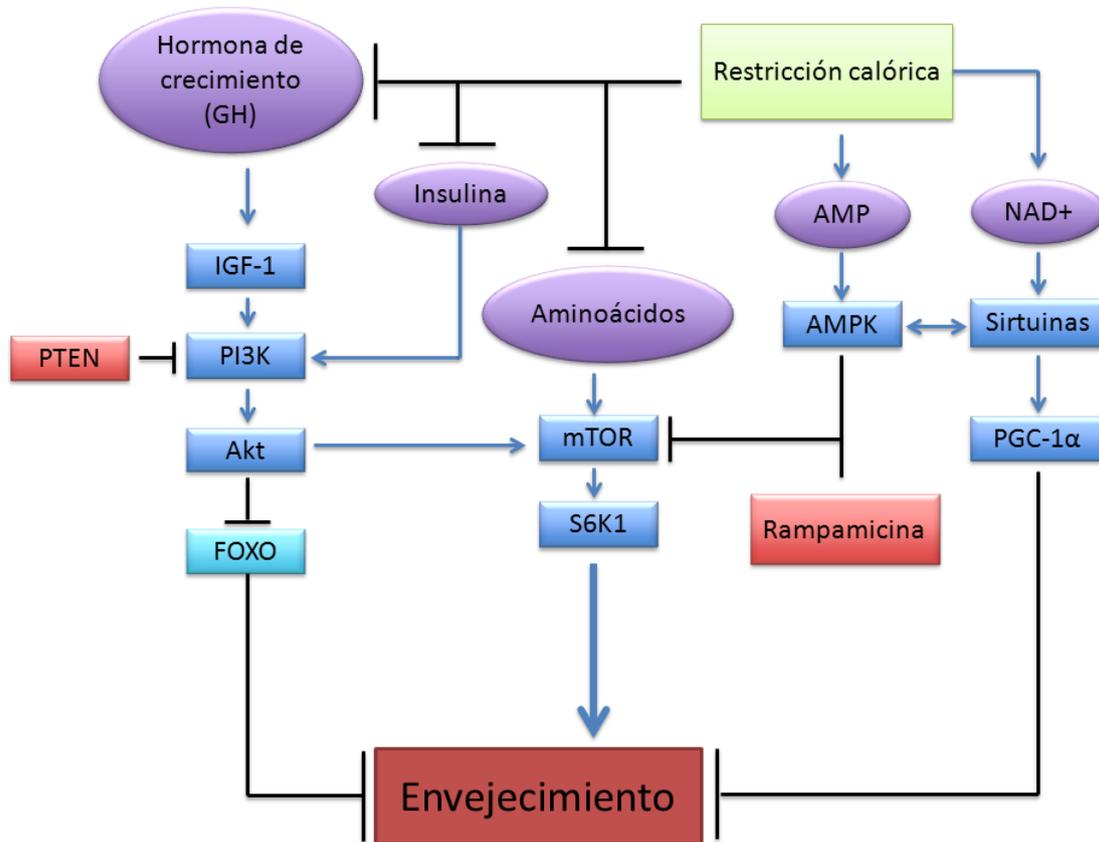
la artrosis se ha asociado a la deficiente autofagia que se produce con el envejecimiento. En los condrocitos existe una activación constitutiva de la autofagia, que se ve comprometida durante el envejecimiento por la disminución de AMPK, molécula clave de la detección de nutrientes, como se explicará en el epígrafe siguiente. Este hecho se ha asociado con un incremento de la apoptosis y degeneración del cartílago [155].

Por el contrario, en la AR se observan otro tipo de cambios en la homeostasis proteica. Por un lado, se incrementan numerosas proteínas del sistema de respuesta a estrés tanto en las células sanguíneas como en el tejido sinovial de los pacientes. Consecuentemente con el incremento de estas proteínas se ven incrementados los niveles de autofagia en los fibroblastos de los pacientes con AR, si bien su papel en la apoptosis o la supervivencia de estas células es aún controvertido [156], [157]. Otro aspecto cuya repercusión no está todavía clara es que varios estudios indican que las chaperonas pueden ser autoantígenos de las células T y B en la AR y que hay autoanticuerpos específicos contra proteínas citrulinadas del sistema de respuesta al estrés.

### **Desregulación de la detección de nutrientes**

La desregulación de la detección de nutrientes implica cualquier alteración del eje somatotrófico. Este eje, en los mamíferos, comprende la hormona de crecimiento (GH), producida por la pituitaria, y su mediador secundario, el factor de crecimiento insulínico (IGF-1). Existen otros sistemas secundarios de detección de nutrientes que participan en la generación de energía y están presentes en la mayoría de los tipos celulares (Figura 6). Algunas de las primeras evidencias indicando que estas rutas participan en la longevidad se obtuvieron en modelos animales con mutaciones en los genes para estas proteínas. Otras evidencias provienen de cambios en la expresión de estas proteínas en animales sometidos a restricción calórica para prolongar su esperanza de vida [158] (Figura 6).

Una de las proteínas más estudiadas dentro del eje insulina-IGF-1 es el factor de transcripción FOXO, cuya implicación en la longevidad está demostrada en moscas y gusanos. En los ratones no se ha podido demostrar posiblemente debido a que existen 4 homólogos frente a la única molécula presente en las moscas y gusanos [159], [160]. Sin embargo, dentro de esta misma ruta, los ratones que sobreexpresan el supresor tumoral fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PTEN) y aquellos con mutaciones de pérdida de función de la quinasa PI3K viven más tiempo [161], [162]. Además, durante el envejecimiento y en modelos animales de envejecimiento prematuro los niveles de GH e IGF-1 disminuyen, considerándose este hecho un intento del organismo de incrementar su supervivencia [163].



**Figura 6. Esquema simplificado de las principales rutas de señalización para la detección de nutrientes en mamíferos y su relación con el envejecimiento.** IGF-1 = factor de crecimiento insulínico tipo 1; PI3K = fosfoinositol 3 quinasa; Akt = PKB = proteína quinasa B; FOXO = proteína *forkhead box*; PTEN = fosfatidilinositol-3,4,5-

trifosfato 3-fosfatasa; mTOR = diana de la rampamicina de mamíferos; S6K1 = proteína ribosomal S6 quinasa; AMP = adenosín monofosfato; AMPK = proteína quinasa activada por AMP; NAD<sup>+</sup> = nicotinamida adenina dinucleótido; PGC-1 $\alpha$  = receptor de proliferación coactivador de peroxisomas 1 $\alpha$ . Basado en *López-Otín y col.* [7].

En cuanto a la ruta de la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK), que detecta niveles elevados de AMP en la célula, su activación promueve un retardo en el envejecimiento mediado por la inhibición de mTOR [164]. Además, la inhibición de mTOR produce un incremento de la longevidad del organismo [165]. Este efecto se ha observado también en los ratones mTORC1 deficientes y en los tratados con rampamicina (inhibidor de mTOR) [166], [167]. El mismo efecto se observa en los ratones deficientes en S6K1, el sustrato principal de mTORC1 [168].

Otra de las rutas secundarias incluye a las sirtuinas que actúan de forma indirecta regulando la vía de señalización de AMPK además de por otras rutas. Las sirtuinas son sensores celulares de niveles elevados de NAD<sup>+</sup>, lo que les lleva a activar PGC-1 $\alpha$  [169]. Esta molécula regula una respuesta metabólica compleja que incluye la biogénesis mitocondrial, refuerzo de la defensa frente al daño oxidativo e incremento de la oxidación de ácidos grasos [170]. Además, las vías de las sirtuinas y de AMPK se retroalimentan positivamente generándose una respuesta conjunta a estados de baja energía en la célula [171].

Tanto en el cartílago envejecido como en el cartílago artrósico de ratón, la quinasa AMPK y otros miembros de la ruta regulados por la misma están reducidos. Este desequilibrio en la detección de nutrientes se ha observado también en cartílago bovino y humano y se ha relacionado con una disminución en la biogénesis mitocondrial [172].

Sin embargo, en la AR existe una elevada controversia sobre las alteraciones en la detección de nutrientes. Algunos estudios han encontrado incrementos en los

niveles de IGF-1 e IGFBP-3 en el suero de pacientes con AR a pesar de que no se correlacionan con características clínicas de la enfermedad. Sin embargo otros estudios no han encontrado diferencias o incluso observan niveles disminuidos de ambas moléculas. De forma similar, existen estudios con resultados discordantes en torno a los niveles de GH en la AR [173].

### **Disfunción mitocondrial**

La mitocondria es un orgánulo clave para la mayoría de tipos celulares puesto que es la vía principal de síntesis de ATP. Dentro de la disfunción mitocondrial pueden englobarse distintas alteraciones de este orgánulo que dificultan no sólo la producción de energía sino que desencadenan respuestas a nivel global en la célula.

La causa principal de disfunción mitocondrial es la pérdida de la eficiencia en la cadena respiratoria, ya que a medida que la célula envejece se produce un mayor número de escapes de electrones [174]. Tradicionalmente se consideró que el incremento de ROS causaba a su vez daños en el ADN y proteínas mitocondriales que retroalimentaban esta disfunción mitocondrial y producían el envejecimiento celular [175], [176]. Sin embargo, en un modelo de ratón deficiente en la polimerasa gamma mitocondrial se demostró que el envejecimiento prematuro observado en otros modelos se producía también sin necesidad de incremento de ROS, simplemente por acumulación de errores en el ADN mitocondrial (ADNmit) [177], [178]. Pero a pesar de los múltiples trabajos que avalan la relación entre las mutaciones en el ADNmit y el envejecimiento, los mecanismos por los cuales tiene lugar son todavía desconocidos. Así, debido al elevado número de copias de ADNmit, las mutaciones en células somáticas generan heteroplasmia y no se ve afectada la función mitocondrial hasta que se supera un determinado umbral de ADNmit mutante [179]–[181]. Este hecho hace improbable que durante la vida de un individuo se acumulen suficientes mutaciones como para producir un acortamiento de la vida [178], [182]. Se han postulado por tanto otras razones por las cuales la mitocondria contribuye al envejecimiento celular.

Los defectos en los procesos que regulan el número de mitocondrias en la célula afectan también al estado energético y constituyen una causa de disfunción mitocondrial. De esta forma, la reducción de moléculas clave para la fusión y fisión de las mitocondrias son detonantes de la entrada de la célula en estado senescente [183]–[185]. De la misma forma el balance negativo de ATP y  $\text{NAD}^+$ , induce la expresión de  $\text{p16}^{\text{INK41}}$ , clave en el proceso de senescencia [186], [187]. Los defectos en la mitofagia, proceso especializado de autofagia de las mitocondrias, se han relacionado con la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer [188], [189]. Todo ello evidencia que una correcta distribución del número y tamaño de las mitocondrias es clave en el envejecimiento celular [190]. Por el contrario, la activación del sistema de respuesta a estrés mitocondrial UPR (*Unfolded Protein Response*) desencadena respuestas de supervivencia celular cuando se produce acumulación de delecciones mitocondriales o de proteínas plegadas incorrectamente. Este sistema desencadena una respuesta coordinada con el núcleo para incrementar la síntesis de chaperonas y permitir la supervivencia de la célula [191], [192].

Por otra parte, la mitocondria necesita un gradiente de protones a través del espacio intermembrana para la correcta producción de ATP. Para mantener una correcta polarización se produce una importación de calcio al interior que está finamente regulada. Si la mitocondria se despolariza se detiene la producción de ATP, se eleva el NADH citosólico y se reduce la actividad de la sirtuina, lo que induce un estado de senescencia en la célula [193], [194]. De forma pareja, la mitocondria actúa como un reservorio de calcio que se libera en respuesta al estrés celular activando en el núcleo diversos genes regulados por elementos CREB (*cAMP-responsive element binding protein 1*). De esta forma se desencadena una respuesta coordinada al estrés que incrementa la expresión de p21 a nivel nuclear para inhibir la proliferación celular [195]. Finalmente, la liberación del citocromo c de la mitocondria activa las caspasas y desencadena la apoptosis de la célula [196].

En cuanto a la disfunción mitocondrial en las enfermedades reumáticas, se ha encontrado un incremento de las mutación en el ADN mitocondrial del tejido sinovial comparado con el de pacientes con artrosis pero no respecto al de pacientes con

artritis psoriásica, de forma independiente de la edad pero relacionado con la sinovitis y los niveles de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  en el líquido sinovial [197].

En condrocitos de pacientes con artrosis se ha visto una disminución de la masa y el contenido de ADN mitocondriales, que producen una desregulación en la cadena de transporte electrónico. Como consecuencia se observa un incremento de especies reactivas de oxígeno que supera la capacidad antioxidante de los condrocitos, contribuyendo al desarrollo de la artrosis [198], [199]. En la AR, por el contrario, los incrementos de ROS se han relacionado con la producción de TNF- $\alpha$  y el aumento de la producción de factores proinflamatorios en los sinoviocitos [200].

### **Senescencia celular**

La senescencia celular se produce tras el arresto del ciclo celular debido a la incapacidad de la célula de seguir dividiéndose. Constituye un nuevo fenotipo celular ya que la mayoría de las células senescentes adquieren morfología alargada y se han descrito numerosos cambios en la expresión génica, el procesamiento proteico y la organización de la cromatina [201]–[204]. Las células senescentes mantienen el metabolismo activo y pueden permanecer vivas indefinidamente [205], [206], ya que desarrollan mecanismos de evasión de la apoptosis [207], [208].

Conceptualmente existen dos categorías de senescencia replicativa. La primera se inicia con la disfuncionalidad de los telómeros u otros tipos de estrés genotóxico que causan la activación de p53 [209], [210]. La segunda, mucho menos estudiada, se caracteriza por la activación de la CDKN2A (quinasa dependiente de ciclina inhibidora de p16<sup>INK4a</sup>). Sin embargo esta distinción se complica puesto que p16 es una proteína regulada por diferentes rutas de respuesta al estrés, incluidas también las de reparación de daños en el ADN. Bioquímicamente, p16 inactiva CDK4 y CDK6, que mantienen la pRb activa, en su forma hipofosforilada, y que consecuentemente bloquea la progresión del ciclo celular en G1 [211]. La expresión de p16 es muy baja o ausente en los organismos jóvenes y se incrementa a medida que avanzan en edad

[212]. Este incremento ocurre de forma primaria a nivel transcripcional y se ha determinado en multitud de tejidos [213], [214]. La senescencia celular se considera por tanto un fenómeno de respuesta a diferentes tipos de estrés que induce el arresto del ciclo celular de forma irreversible [215]–[217]. Esto implica que la senescencia tiene una función supresora de tumores, lo cual explicaría que se haya mantenido a lo largo de la evolución pese a la contrapartida del envejecimiento [218], [219]. Sin embargo, existe cierta controversia a raíz de estudios que demuestran que algunos de los factores secretados por las células senescentes favorecen el desarrollo tumoral, proponiéndose la apoptosis como el mecanismo anticancerígeno más eficiente evolutivamente [220].

La secreción de citoquinas proinflamatorias y otras proteínas por parte de las células senescentes se ha denominado fenotipo SASP (*Senescent-Associated Secretory Phenotype*). La secreción de estas moléculas hace que las células senescentes sean visibles al sistema inmune y facilita así su aclaramiento [221]. Las células senescentes con fenotipo SASP contribuyen a generar un ambiente inflamatorio que podría explicar el incremento de la inflamación que tiene lugar durante el envejecimiento de forma inespecífica. Además, los factores que secretan las células senescentes son especialmente importantes debido a que confieren efectos sistémicos al proceso de senescencia [222].

El papel de las células senescentes en el envejecimiento ha quedado demostrado por la correlación entre la capacidad de división de las células en cultivo y la longevidad de la especie de la que proceden [223], por la reducida proliferación de las células de pacientes con síndromes progeroides [224] y por la acumulación de células senescentes en los tejidos a medida que el organismo envejece [214], [225]. Además recientemente se ha probado que la eliminación de las células senescentes mediante un modelo de ratón BubR1H/H con progeria que expresa caspasa 8 de forma inducible por p16<sup>INK4a</sup>, produce un retraso de la disfunción de los tejidos [226].

Es importante destacar que las células senescentes difieren de las células quiescentes o que pierden la capacidad de replicación en que estas lo hacen debido al proceso de diferenciación y no en respuesta al estrés o daños en el ADN. Por otra parte, las células senescentes tienen resistencia a la apoptosis y alteraciones en las funciones celulares [227] y nunca alcanzarían el fenotipo SASP [228].

En cuanto a las enfermedades reumáticas, diversos marcadores de senescencia como p53, p16 y SA- $\beta$ -gal celular se han visto incrementados en el tejido sinovial tanto de AR establecida como de reciente comienzo e incluso se han visto variantes mutadas de p53 que favorecen la proliferación de los fibroblastos y la producción de IL-6 [229]. Diversos estudios apuntan a que la senescencia afecta también a las células madre hematopoyéticas de la médula ósea durante la AR. Así, estas células tienen menor capacidad para formar colonias que las derivadas de controles sanos y mayor tasa de apoptosis. Sin embargo, esta senescencia de las células madre es independiente de la actividad de la enfermedad y su duración, e incluso indiferente en pacientes tratados y no tratados si bien la elevación de TNF- $\alpha$  en la médula ósea parece incrementar la apoptosis de las células madre hematopoyéticas [230].

En relación a la artrosis, a pesar de que los condrocitos tienen tasas bajas de replicación, se han descubierto linajes destinados a la regeneración y mantenimiento del cartílago que pierden su capacidad proliferativa agravando la enfermedad [155]. Además, se ha descubierto que la senescencia de los condrocitos es dependiente de la p16<sup>INK4a</sup>, estando relacionada en mayor medida con la respuesta al estrés celular que con el fin de la capacidad de replicación [231]. Sin embargo, el papel más importante de las células senescentes en esta patología se debe al desarrollo del fenotipo SASP. La producción de citoquinas inflamatorias y enzimas que degradan la matriz extracelular agravan la patogénesis de la artrosis erosionando la matriz extracelular y retroalimentando los procesos de degradación [232].

## Extenuación de las células madre

Las células madre se caracterizan por su capacidad de autorrenovación mediante divisiones asimétricas y de diferenciación en uno o más tipos celulares distintos. El tamaño de la población de células madre puede por tanto crecer si se favorece la autorrenovación o disminuir si se favorece el proceso de diferenciación [233]. Las células madre de adultos residen en diferentes órganos y en condiciones normales son capaces de diferenciarse en un número limitado de tipos celulares que conforman dicho órgano. Son más frecuentes en tejidos con mayor desgaste y necesidad de regeneración como la piel o la mucosa intestinal que en otros como el cerebro y el músculo [234]–[236]. En comparación con las células madre embrionarias, las células madre del adulto tienen una capacidad limitada de mantenimiento de la longitud de sus telómeros. Los niveles de actividad de la enzima telomerasa medidos no parecen ser suficientes para evitar su acortamiento y por lo tanto estas poblaciones no son inmortales como ocurre en las células embrionarias [237]. Esta capacidad proliferativa finita parece estar relacionada también con las rutas de INK4b/ARF-p53 [238].

El papel de las células madre en el envejecimiento se ha descrito en diferentes modelos murinos deficientes en genes como *Terc*(-/-), *Ku86*(-/-), *LIG4*(Y288C), *XPD*(R722W/R722W), etc. En los que se inhibe la renovación de los tejidos y se acelera la aparición de características del envejecimiento [212–215]. Durante el envejecimiento normal se produce un aclaramiento de las células senescentes, que lleva aparejado una movilización de las células progenitoras para renovar el tejido y mantener el número de células del mismo. En los organismos envejecidos este proceso de recambio se vuelve ineficiente debido a la pérdida de la capacidad de división de las células progenitoras, favoreciendo la acumulación de células senescentes. El agotamiento de las células madre puede deberse a todas las características descritas en los puntos anteriores, agravando el proceso de envejecimiento. Existen por tanto células madre envejecidas, que se caracterizan por un incremento en la generación de ROS intracelular, daños mitocondriales, activación de la ruta PI3K-mTOR, daños en el ADN, desequilibrios en la proteostasis y bajos niveles de SIRTUINA 1 y factores de

transcripción como FOXO, que regulan los procesos de envejecimiento como ya se ha descrito anteriormente. La generación de ROS fuerza a las células madre a salir del estado de quiescencia y dividirse mediante la activación de la ruta de señalización de PI3K-AKT. Además se desencadena la respuesta a estrés dependiente de FOXO y se promueve la autofagia. También se producen alteraciones epigenéticas, incluidas la metilación del ADN y la acetilación de las histonas que juegan aquí un papel clave ya que son los principales mecanismos implicados en la diferenciación de la célula madre a los distintos tipos de células diferenciadas a los que puede dar lugar [239].

Conocer los mecanismos moleculares que conducen al envejecimiento de las células madre es una aproximación crítica a la hora de estudiar las causas comunes que pueden subyacer a distintas comorbilidades [239]. Además muchas de las terapias contra el envejecimiento prematuro de ciertos tejidos se han centrado en el estudio de la reprogramación de las células madre pluripotenciales [240].

En la artritis reumatoide, diversos estudios han sugerido alteraciones en los niveles de las células madre hematopoyéticas como causa del envejecimiento prematuro de las células T periféricas observado en los pacientes. Además, estas células sufren una tasa mayor de apoptosis en los pacientes con AR que está relacionado con defectos en la ruta ERK (ruta de quinasas regulada por señales extracelulares) [241], [242].

En la artrosis, se ha demostrado la existencia de células en la superficie del cartílago embrionario que constituyen un reservorio de células progenitoras para la maduración de los futuros condrocitos de las capas profundas. Sin embargo, el papel de la senescencia o el envejecimiento prematuro de estas células en la artrosis todavía no ha sido esclarecidos [232], [243].

## **Alteraciones de la comunicación intracelular**

El envejecimiento afecta no solo a la célula de forma individual sino también a las comunicaciones intercelulares tanto endocrinas, como neuroendocrinas y neuronales. La producción de hormonas por parte del sistema nervioso tiende a reducirse con la edad mientras que las señales inflamatorias se incrementan y en general el ambiente extracelular cambia con el envejecimiento [244], [245].

En relación a la inflamación se ha descrito un fenotipo característico conocido en inglés como “*inflammaging*” que se caracteriza por un incremento de la inflamación de forma espuria en los mamíferos envejecidos. Esta inflamación puede deberse a la ineficiencia del sistema inmune para eliminar patógenos o células disfuncionales, al fenotipo SASP de las células senescentes, al incremento de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B o a mecanismos defectuosos de autofagia [246]. Estos desencadenantes inician la formación del inflammasoma, que es un gran complejo multiproteico que se expresa en las células del sistema inmune innato y que controla la activación de la caspasa-1 y la secreción de IL-1 $\beta$  y IL-18 [247]. Su activación es dependiente de la proteína mitocondrial NLRP3, cuya depleción conlleva una disminución de activación de este complejo y una disminución de la respuesta inmune innata a medida que el organismo envejece. Diversos estudios han enfatizado la importancia de esta inflamación a nivel transcripcional [248], y se ha demostrado que la inhibición de la transcripción de NF- $\kappa$ B rejuvenece tejidos como la piel [249], y previene el fenotipo envejecido en modelos de ratón [250], [251].

Sin embargo, de forma paralela a este incremento en la inflamación basal, se produce una disminución de la respuesta del sistema inmune adaptativo e innato, conocida como inmunosenescencia [252]. Esta disminución tiene lugar debido a la involución del timo y la sustitución de la médula ósea por tejido graso, fenómenos clásicamente asociados con el envejecimiento. Pero además, a medida que el individuo envejece se reduce la capacidad de fagocitosis, de migración celular, tienen lugar cambios en el número y proporción de las células sanguíneas y disminuye también la

producción de anticuerpos específicos [253]. Esta disminución de la respuesta inmune es responsable de un incremento del riesgo a sufrir infecciones, un peor aclaramiento de las células senescentes y un incremento de células tumorales [254].

Se ha estudiado también otro tipo de sistemas de comunicación entre células que facilita la homogeneización de la información entre las células del órgano que conforman. Un ejemplo son las uniones adherentes, que facilitan el tránsito de ROS y citoquinas generando lo que se conoce como “efecto espectador”, en el que a medida que aumenta el número de células implicadas en un proceso resulta más fácil que las células vecinas se involucren en él [255]. De esta forma, el envejecimiento en un tejido conduce a deterioro en otros tejidos, dando lugar al fenómeno conocido como envejecimiento organismal [256].

En muchas de las enfermedades reumáticas la inflamación es un componente clave en el desarrollo de la patogénesis. En los pacientes con artritis reumatoide se han observado cambios de los niveles de diferentes tipos celulares del sistema inmune así como incrementos sistémicos en los niveles de enzimas proinflamatorias. Además, los fibroblastos derivados de pacientes de AR que se vuelven senescentes tras varios pases celulares, producen una mayor cantidad de IL-6, IL-8, VEGF y PGE2 en respuesta a IL-1 $\beta$  que las células de pases tempranos, lo que típicamente se ha relacionado con el fenotipo SASP [257].

Tras esta breve descripción los mecanismos implicados en el envejecimiento podemos afirmar que se trata de un proceso complejo, resultado de la sinergia de todos estos mecanismos, que presentan relaciones intrincadas entre sí. Por esta razón, resulta difícil encontrar dianas terapéuticas que puedan ser objeto de fármacos para revertir los efectos patológicos de un envejecimiento exacerbado. Sin embargo, en algunas enfermedades se ha sugerido la implicación de forma más destacable de alguno de estos componentes, cuya desregulación prevalece sobre otros factores. El estudio de estos casos particulares ha dado lugar a la aparición de diferentes teorías del envejecimiento que resumiremos a continuación.

### 3. Teorías sobre el envejecimiento

Desde la teoría de Weissman en 1881, mencionada al principio de este documento, se han sucedido y coexistido otras y muy diversas teorías acerca del envejecimiento, sin que existan suficientes evidencias científicas para descartar o postular ninguna de ellas como verdadera. Tanto es así, que algunas de las teorías clásicas han sido actualizadas en base a los nuevos descubrimientos científicos manteniéndose las mismas premisas de base. Es el caso de la teoría de Weissman, revisada por Minot en 1907, que mantiene la idea de que el envejecimiento es el precio a pagar por la diferenciación celular o la teoría de los radicales libres de Harman, 1956, revisada por Gerschman en 1962 [258].

La mayoría de teorías propuestas hasta el momento apuntan a alguno de los mecanismos expuestos anteriormente como causa del envejecimiento: teoría de acumulación de mutaciones, teoría metabólica, teoría del acortamiento telomérico, teoría de la resistencia a la insulina, teoría del detrimento del sistema inmune, teoría del daño mitocondrial, etc. lo que no hace más que evidenciar la compleja y variable etiología del envejecimiento [259], [260].

Sin embargo todas estas teorías podrían agruparse en dos grandes corrientes de pensamiento: la del envejecimiento como un evento programado y la del envejecimiento como consecuencia de la acumulación de daños. En la primera se incluyen teorías como la antagonista pleiotrópica de Williams (1957), que propone la existencia de genes que se expresan de forma beneficiosa para el organismo en las etapas tempranas de su vida pero son nocivos pasada la madurez sexual del individuo [261]. Se englobarían en esta categoría también las teorías que postulan el envejecimiento como consecuencia del decaimiento del sistema inmune o endocrino [262]. Así por ejemplo, en las enfermedades reumáticas se postula un decaimiento del sistema inmune como posible causa del desarrollo de la patología, observándose en múltiples casos que la inmunosenescencia precede al desarrollo de la enfermedad. De esta forma el envejecimiento prematuro ocasionaría la aparición de las enfermedades

conocidas como de edad avanzada en el individuo [55], [263]. En el lado opuesto se encuentran las teorías del uso y desgaste, en las cuales el organismo acumula daños en ADN o proteínas que reducen la funcionalidad de los tejidos [264]. En línea con esta teoría, recientemente varios artículos han postulado que el envejecimiento prematuro da lugar a un incremento en la vulnerabilidad de los tejidos afectados, pudiendo desencadenarse enfermedades como la artrosis [265], [266] o las enfermedades neurodegenerativas [267].

#### **4. Medición del envejecimiento como proceso biológico**

Basándose en estas teorías que resaltan el carácter multifactorial del envejecimiento, es improbable que exista un único biomarcador capaz de recoger toda la variabilidad existente y proporcionar una medida universalmente válida de edad biológica. Sin embargo, existe la necesidad de medir la edad biológica para poder distinguir entre un envejecimiento saludable y normal, de un envejecimiento prematuro o acelerado que podría ser factor de riesgo de múltiples enfermedades [268]. Existen intentos recientes de combinar datos de diferentes marcadores mediante análisis de componentes principales para obtener medidas de edad biológicas que engloben los diferentes aspectos etiológicos mencionados, si bien queda mucho camino por recorrer para su validación [269], [270]. Actualmente el proyecto europeo MARK-AGE tiene como objetivo el análisis de diferentes parámetros en 3200 individuos para lograr la combinación óptima que prediga la edad biológica [271]. Sin embargo, intentos previos de biomarcadores globales no han sido replicados o han mostrado peores resultados que algunos marcadores únicos [272], [273].

Existen una serie de características establecidas por la Federación Americana de investigación del envejecimiento para que un biomarcador de edad biológica sea considerado válido [274]:

- a) Predecir la tasa de envejecimiento, o en otras palabras, predecir en qué posición se encuentra un individuo dentro de su esperanza de vida. Por lo tanto, debe ser mejor predictor de la mortalidad que la edad cronológica.

- b) Reflejar el proceso básico de envejecimiento y no efectos de enfermedades relacionadas.
- c) Determinarse de forma repetida de forma no invasiva.
- d) Ser válido en humanos y modelos animales como el ratón.

Esta última característica ha sido cuestionada debido a la gran diferencia en la tasa de envejecimiento entre los diferentes mamíferos usados como modelos animales [271]. Sin embargo, si bien el biomarcador idóneo tendrá como objetivo reflejar la esperanza de vida del individuo, hay que tener en cuenta que existen biomarcadores que presentan una baja correlación con la mortalidad pero son ampliamente utilizados por su elevada correlación con otras manifestaciones del envejecimiento como la disminución en la capacidad cognitiva y la forma física del individuo. De esta forma, en función de la finalidad del estudio, existirán biomarcadores con mayor o menor utilidad, independientemente de su relación con la esperanza de vida.

Sin embargo, la optimización de los distintos biomarcadores de la edad cuenta también con una serie de problemas específicos de los biomarcadores del envejecimiento que dificultan su búsqueda y su aplicación.

En primer lugar cabe destacar que los distintos tejidos y órganos de un individuo pueden tener tasas de envejecimiento diferentes. Este punto es especialmente conflictivo, pues como se ha mencionado previamente, existe un envejecimiento a nivel local o tisular, diferente del envejecimiento organismal, más difícil de capturar con un único biomarcador, si bien probablemente sea de mayor utilidad. Además, se debe buscar un equilibrio entre las diferentes variables y su peso, para que la medida no esté más influenciada por unos aspectos concretos del envejecimiento, llegando a un compromiso que no implique un número demasiado elevado de variables.

La población objeto de estudio para la búsqueda de los biomarcadores es otro de los puntos conflictivos. Si bien lo ideal es que el rango de edad sea lo más amplio posible, existe una diferencia importante entre la tasa de envejecimiento a edades

tempranas y en la etapa adulta. Por otra parte, los individuos de edad más avanzada tienen mayor probabilidad de padecer enfermedades y han acumulado durante un mayor periodo de tiempo los efectos dañinos de exposición a diferentes parámetros ambientales, como el tabaco, que podrían sesgar los resultados en función de la frecuencia de la exposición de los diferentes en la población estudiada. Por ello, se ha sugerido el estudio de grupos de edad media con un rango de al menos 30 años, excluyendo individuos afectados por enfermedades, tanto en el momento de la recogida de la muestra como anteriores, así como hábitos o estilos de vida que pudiesen repercutir en su salud, si bien es difícil tener en cuenta todos estos parámetros cuando se trata de poblaciones grandes. Asimismo, deben evaluarse las diferencias entre sexos y si existen diferencias en las tasas de cambio en la juventud, para establecer la población en la que son útiles cada uno de los marcadores [275].

Por otra parte, modelizar una o más variables para realizar una estimación de edad biológica requiere de algunas consideraciones estadísticas cuya solución no es siempre sencilla. La primera de ellas es el hecho de que a diferentes edades la ratio de envejecimiento es diferente. Por lo tanto, es importante centrar los modelos en etapas concretas o bien utilizar modelos que incluyan este cambio en la tasa de envejecimiento para minimizar la introducción de sesgos en las predicciones. Además, los modelos tanto univariantes como multivariantes de regresión lineal, presentan un sesgo poco reconocido en la literatura y que ha adoptado nombres como regresión a la media o *"dilution regression bias"*. Este sesgo implica un incremento del error de predicción con la edad inherente al uso de la regresión pero cuya influencia en los resultados debe evitarse utilizando individuos pareados por edad en los grupos de estudio sometidos a comparación. Esta medida solventa a la vez el problema de las diferentes ratios de envejecimiento a diferentes edades. Si esto no es posible, los análisis deben realizarse de forma estratificada por grupos de edad o bien corregir por la propia edad cronológica [275], [276].

Por último, las medidas de edad biológica suponen la determinación de determinadas modificaciones relacionadas con el envejecimiento en el transcurso de la

vida de un individuo. Por ello, en los estudios transversales incluyen todos los posibles factores de confusión que previamente han influido en la edad biológica del individuo, aunque no necesariamente estén presentes en el momento del estudio. El hábito tabáquico, el estrés o las enfermedades infecciosas ejemplifican de forma clara este problema. Por ello, es preferible la validación de los biomarcadores de la edad en estudios longitudinales, que permiten determinar los cambios de la edad biológica de forma más próxima a la realidad. Sin embargo, determinados biomarcadores presentan un error demasiado grande teniendo en cuenta que las determinaciones realizadas en las cohortes longitudinales suelen llevarse a cabo en periodos de 10 años [276], [277].

Si bien existen en la bibliografía diferentes biomarcadores correlacionados con la edad, solo incluiré aquellos más relevantes y utilizados en el estudio de las enfermedades reumáticas.

### **Deleciones mitocondriales**

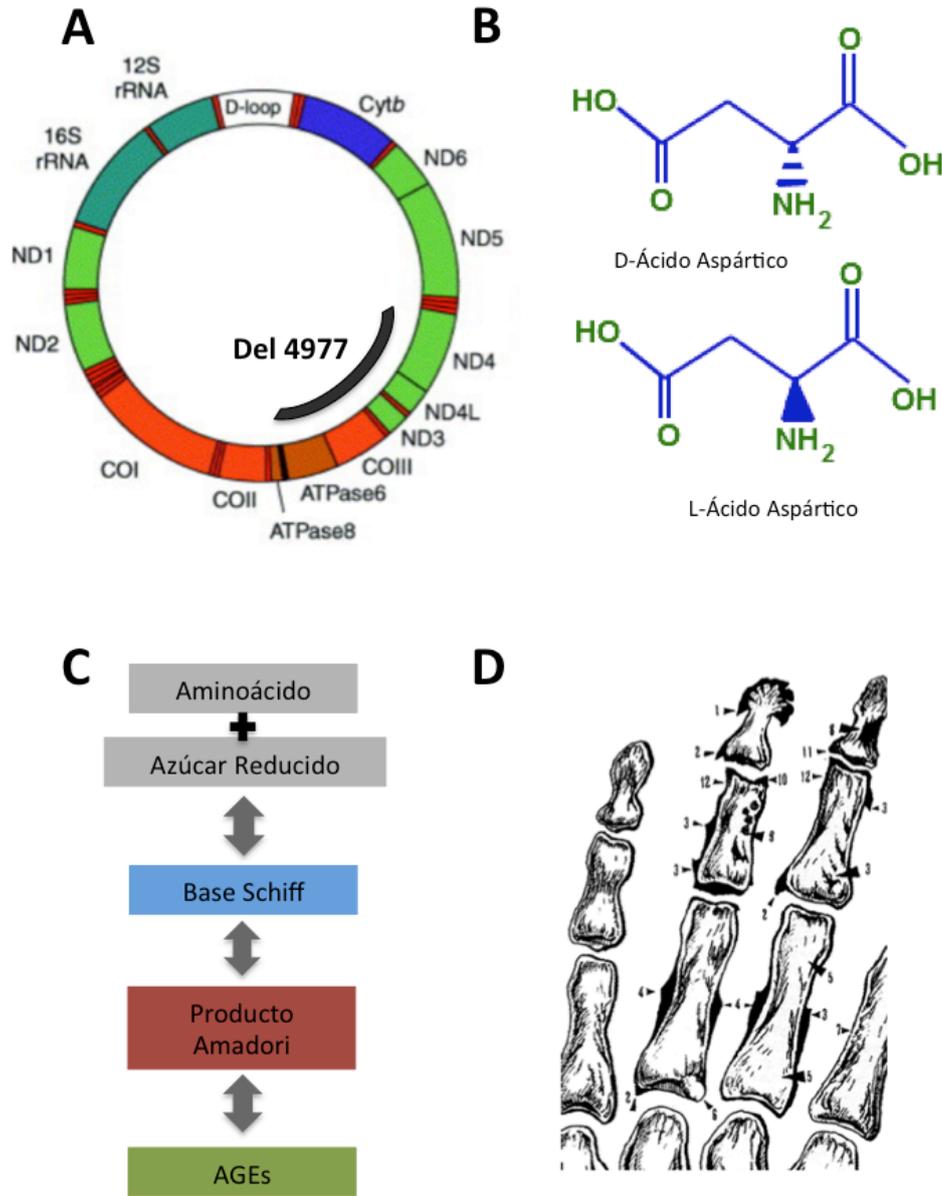
Las mutaciones son eventos estocásticos que implican el cambio de una o varias bases del genoma. En las células somáticas, las mutaciones en el ADN mitocondrial se acumulan con el paso del tiempo dando lugar a un patrón tejido específico. Se expanden desde el momento en que aparecen y a medida que tienen lugar las divisiones celulares, no obstante, se ha calculado que se necesitan unas tres décadas para que sea detectable una mutación en el ADN mitocondrial de una célula somática. Esto hace que estas mutaciones tengan una tasa de acumulación de  $10^4$  desde la infancia hasta la vejez [278].

Para la estimación de la edad biológica, la deleción 4977 es la más común y por tanto, estudiada en gran variedad de tejidos [279] (Figura 7A). Se puede analizar mediante PCR en tiempo real, que se considera el estándar oro, ensayos de hibridación o PCR de diluciones seriadas, si bien este último método tiene grandes discordancias con otros métodos de PCR utilizados. El coeficiente de correlación entre la frecuencia

de la deleción en músculo y la edad cronológica es de  $r=0.83$ . Sin embargo, su correlación con la edad cronológica es menor en otros tejidos estudiados, como ventrículo derecho ( $r=0.57$ ) o riñón ( $r=0.64$ ) y no se ha observado ninguna correlación en sangre completa ni subpoblaciones de células sanguíneas [280]–[282].

Los problemas principales de este biomarcador son su dependencia de la división celular y el fenómeno de heteroplasmía en los tejidos en que la mutación se encuentra correlacionada con la edad. Las mutaciones mitocondriales no se encuentran distribuidas uniformemente ni dentro ni entre distintos tejidos por lo que el muestreo debe ser amplio y siempre en el mismo tejido para toda la población objeto de estudio [283].

Finalmente, las diferencias encontradas entre la edad estimada y la edad cronológica del individuo alcanzan los 40 años, pudiendo solo categorizarse individuos como jóvenes o ancianos. Estas diferencias podrían deberse a factores externos que influyen la tasa de mutación mitocondrial. Así, se ha visto un incremento de la deleción en tejido cardíaco en individuos que fallecen debido a muerte súbita y en el tejido renal en pacientes en los últimos estadios de enfermedades renales. Sin embargo, se desconocen las causas de las mutaciones mitocondriales debido a la falta de comprensión de los mecanismos de replicación del ADN mitocondrial. Se ha propuesto que un incremento en las especies reactivas de oxígeno produciría mutaciones espontáneas en el ADNmit independientes del mecanismo de replicación. En cualquier caso, con errores de predicción tan amplios es inviable su utilización en estudios de casos y controles, en los que las edades de los sujetos son semejantes [280].



**Figura 7. Fundamento de diferentes biomarcadores de edad.** A) Situación de la delección mitocondrial 4977 y genes afectados por la misma B) Racemización del ácido aspártico, isómeros D y L C) Formación de productos de glicosilación avanzada o AGEs y D) Esquema de puntos a tener en cuenta para la evaluación del sistema de puntuación oseográfico mediante radiografía de mano. 1, 2, 3 y 4 son diferentes formas de proliferación del hueso; 5 y 6 son manifestaciones de porosidad ósea, 8, 9 y 10 son formas de esclerosis y 11 y 12 son deformidades no debidas a trauma. Basado en Zapico y col., Meissner y col. y Kalichman y col. [280], [284], [285].

## Racemización del ácido aspártico

Durante la síntesis proteica en las células de mamíferos se incorporan exclusivamente L-aminoácidos. A medida que el organismo envejece se incrementa la inestabilidad química y se transforman los residuos de algunos aminoácidos al azar, de forma independiente a la acción enzimática (Figura 7B). De esta forma, mediante hidrólisis de proteínas, se detectan incrementos en la concentración del isómero D del ácido aspártico que son dependientes de la edad. Este proceso se conoce como racemización del ácido aspártico (AAR por sus siglas en inglés, *Aspartic Acid Racemization*) y se correlaciona con la edad sobre todo en proteínas como la dentina, que se encuentra aislada metabólicamente y a una temperatura prácticamente constante a lo largo de la vida del individuo [286].

La determinación de la edad por este método empezó a llevarse a cabo hace más de 30 años en tejidos humanos. Se ha establecido la dentina como proteína óptima en el que la  $r=0.988$ . Sin embargo, pueden utilizarse otros tejidos siempre y cuando se purifique un tipo de proteína específica con bajo recambio como por ejemplo la osteocalcina de hueso o la elastina en piel, arterias y ligamentos. La determinación de AAR en estas proteínas también ha mostrado elevada correlación con la edad ( $r=0.99$ ). La desviación de la estimación y la edad real se ha estimado en 1.5 a 4 años, siendo el método más utilizado para la estimación de la edad de esqueletos en ciencias forenses. Sin embargo, y aunque en teoría todos los tejidos presentan proteínas permanentes con niveles bajos de recambio, se necesita de la estandarización de protocolos y la obtención de curvas patrón específicas para hacer los resultados comparables [280].

Los protocolos para llevar a cabo la determinación de esta modificación proteica son complejos y requieren de una elevada estandarización para la obtención de resultados comparables. Así, en el caso de la dentina, para cada diente debe establecerse una curva de calibrado diferente e incluso para cada área dentro de un mismo diente. Además, los procesos de fijación de los tejidos con formaldehído y la

utilización de ácidos fuertes en la extracción proteica generan resultados inconsistentes.

En cuanto al método de determinación de la modificación aminoacídica puede realizarse tanto por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como por cromatografía de gases (GC), si bien teóricamente los resultados deberían ser iguales, en la práctica requieren también de curvas de calibrado diferentes y consideraciones específicas en cada caso[287].

No obstante, el punto débil de este método es que requiere de la destrucción de tejidos que solamente están disponibles post-mortem, siendo poco frecuente su aplicación en individuos vivos (solo cirugías de extracción dental o reemplazamiento articular).

En cuanto a las enfermedades reumáticas, *Catterall y col.* estudiaron el cartílago de pacientes con artrosis en relación al cartílago de pacientes con traumas, observando una correlación entre la racemización del ácido aspártico y el grado de lesión histológicamente medido mediante la escala de Mankin [288]. Sin embargo, también han observado recientemente que los pacientes con artrosis en la cadera presentan un envejecimiento de 10 años mientras que los cartílagos de los pacientes con artrosis de rodilla serían unos 30 años más jóvenes que los controles [289].

### **Productos de glicosilación avanzada**

Los productos de glicosilación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés *Advanced Glycation Endproducts*) son un grupo de compuestos formados por reducciones de azúcares independientes de la acción enzimática. Se trata de un grupo heterogéneo de modificaciones de los alfa-carbonilos que sufren reacciones oxidativas y no oxidativas en lípidos, proteínas e incluso ácidos nucleicos. La reacción se detalla en la Figura 7C. Al igual que ocurre con la racemización del ácido aspártico, los AGEs se incrementan durante el envejecimiento normal del organismo y pueden determinarse en tejidos

con bajo recambio proteico como cartílago, tendones y tejido neuronal, especialmente en determinadas proteínas como el colágeno. Esta acumulación produce cambios en la funcionalidad del tejido y en la respuesta inflamatoria. Además, se observa un incremento de AGES en los individuos con diabetes, estrechamente relacionado con la mayor concentración de glucosa en sangre [280].

La determinación de estos productos puede llevarse a cabo mediante ELISA con anticuerpos monoclonales o policlonales, inmunohistoquímica, HPLC, cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) o fluorimetría en el caso de los AGEs como la pentosidina que son autofluorescentes. Para la detección de las cantidades más bajas hasta el momento se han descrito técnicas de MALDI-TOF y cromatografía líquida unida a espectrometría de masas (LC-MS). Sin embargo, la técnica más simple, rápida y precisa es la GC-MS [280].

Los coeficientes de correlación entre la edad y los AGES en neuronas piramidales, cartílago y tendón de Aquiles son  $r=0.83$ ,  $r=0.9$  y  $r=0.54$  respectivamente utilizando métodos fluorimétricos para su determinación [280]. Se ha descrito también una correlación moderada en suero ( $r=0.74$ ) [290]. Mediante GC-MS se demostró que la correlación de tres tipos de AGES con la edad es dependiente de la tasa de recambio en de las proteínas en los diferentes tejidos. Así, los resultados de correlación en cartílago y piel fueron significativamente diferentes ( $r=0.89$ ,  $0.88$  y  $0.93$  para cartílago y  $r=0.80$ ,  $0.72$  y  $0.81$  en piel), revelando que la tasa de recambio es el factor más importante a tener en cuenta a la hora de la estimación de la edad mediante AGEs [291].

La fiabilidad de este método a la hora de realizar estimaciones de la edad es difícil de establecer debido no solo a la heterogeneidad en las metodologías de análisis sino también a la amplia variedad de compuestos que pueden ser analizados. En general muestran una buena linealidad pero baja reproducibilidad inter e intra-ensayo y los umbrales de detección son elevados. Además, las mediciones colorimétricas no

son fiables por encima de los 45 años, puesto que la desviación estándar es muy grande [286].

En cuanto a las enfermedades reumáticas los AGEs se han encontrado incrementados en el cartílago durante el envejecimiento y la artrosis. Especialmente característico es el incremento de pentosidina [292], que confiere el color amarillento típico del cartílago de individuos de edad avanzada. Además, la acumulación de AGEs genera entrecruzamientos entre las moléculas de colágeno que alteran las propiedades biomecánicas del cartílago incrementando su susceptibilidad a la artrosis [293]. La pentosidina también se ha encontrado incrementada en pacientes de AR respecto a pacientes con artrosis, y los niveles tanto del fluido sinovial, como de suero y orina presentan una elevada correlación. Otros AGEs se han encontrado incrementados también en pacientes con AR respecto a controles sanos y a otras enfermedades reumáticas como la artrosis o el lupus eritematoso sistémico [293], [294].

### **Sistemas de puntuación oseográficos**

A finales del siglo pasado comenzaron a utilizarse diferentes medidas basadas en cambios radiográficos para estimar la edad biológica. Uno de los primeros sistemas de puntuación oseográfico fue el de Tanner-Whitehouse. Este sistema se basa en la comparación de las distintas falanges con un atlas de referencia, asignando las diferentes puntuaciones a cada falange. Sin embargo, el atlas muestra solo ocho estados de maduración, y se consiguen estimaciones de edad útiles en el ámbito de la pediatría y la medicina forense cuando se trata de averiguar la edad de un individuo durante su etapa de desarrollo. Sin embargo, una vez el hueso ha alcanzado su total maduración no es posible establecer una edad precisa [295]. Para realizar una estimación de la edad en etapas posteriores a la edad adulta del individuo, se diseñaron sistemas basados en la aparición de signos del envejecimiento en el hueso, como determinadas formas de proliferación, aumento de la porosidad y ciertas deformidades óseas. Uno de estos sistemas, conocido como *Osseographic Scoring*

*System* (OSS), se basa en determinadas modificaciones catalogadas en la figura 6D, que sufre el sistema esquelético durante el desarrollo del individuo adulto. Se ha visto que el OSS está relacionado con el estado global de salud del individuo y predice la mortalidad, sobre todo en individuos de mediana edad. Además, su varianza está explicada principalmente por factores genéticos (57%) mientras que el sexo, la altura, el BMI, el nivel de estrógenos y la menopausia explican apenas un 6%. Estas características lo hacen idóneo para la predicción de la edad biológica del individuo [285].

El OSS suele restringirse al análisis de la mano por razones prácticas, ya que mediante una única radiografía permite la evaluación de 27 huesos completos, cuyos cambios están relacionados con la edad. Sobre las radiografía de los distintos individuos se realizan medidas osteométricas (de longitud, grosor y densidad de los huesos) y osteográficas (determinación de la presencia de centros de osificación, osteofitos, nódulos de Heberden entre otras modificaciones que aparecen típicamente con el paso del tiempo). De esta forma se establece un sistema de puntuación que permite asignar un valor a cada individuo en función de la aparición de determinadas características en la radiografía dorso palmar [296] (Figura 7D).

Este sistema de puntuación oseográfico tiene una correlación elevada con la edad cronológica ( $r=0.8$ ) aunque varía en función del grupo étnico y el sexo. La desviación estándar de la predicción oscila entre 1 y 8 años incrementándose de sujetos jóvenes a ancianos progresivamente [296].

En estudios más recientes se han realizado algunas modificaciones sobre este sistema de puntuación de forma que se tenga en cuenta no solo el número de cambios radiográficos sino su naturaleza, ponderados según su prevalencia, severidad y localización. Además, se ha señalado la fiabilidad intraobservador como satisfactoria para diversas características analizadas, si bien no existe ningún estudio en el que diversos examinadores evalúen el OSS en la misma cohorte [297].

## Longitud de los telómeros

El acortamiento telomérico es la medida de edad biológica más utilizada hasta el momento. El conocimiento del mecanismo mediante el cual la longitud de los telómeros disminuye con el paso del tiempo y el hecho de que está relacionado con múltiples enfermedades de edad avanzada así como con el cáncer ha hecho de este marcador el método por excelencia, si bien hoy se sabe que solo recoge una parte de la etiología compleja del envejecimiento. Además, la demostración de que la medición de la longitud de los telómeros en células de sangre periférica estaba correlacionada con el acortamiento sufrido en los tejidos afectados por diversas enfermedades permitió su expansión como biomarcador de envejecimiento. Sin embargo, como puntos débiles de este biomarcador cabe destacar la baja sensibilidad y la heterogeneidad de las técnicas para su determinación, que han dado lugar a una falta de reproducibilidad de los resultados de asociación [280].

El acortamiento telomérico puede determinarse mediante diversas técnicas basadas en la especificidad de la secuencia de ácidos nucleicos, es decir, la unión de una sonda o cebador específico de la región telomérica. Los diferentes métodos descritos pueden aplicarse al conjunto de células de la muestra, a una célula única y a cada cromosoma individualmente, existiendo por tanto diferencias en las medidas para un mismo individuo. El método considerado actualmente como el estándar oro es el *Southern blot*. Mediante este método se obtiene una medida absoluta de la longitud de los telómeros promedio de las diferentes células que componen la muestra. Sin embargo, es un método laborioso, que requiere del corte del ADN con enzimas de restricción, su separación en geles de agarosa y transferencia a una membrana de nylon, donde se hibridan con sondas específicas. El resultado es un bandeo que revela la longitud de los telómeros de todas las células de la muestra, de forma que se asigna un valor promedio para cada muestra. Sin embargo, esta técnica muy laboriosa, requiere de una gran cantidad de ADN y tiene la limitación de que en la medida se incluyen las regiones subteloméricas [298].

Otro de los métodos basado en la hibridación de sondas es el ensayo de protección (HPA; *Hybridisation protection assay*), mediante el cual se hibridan oligonucleótidos directamente con el lisado celular y se mide la intensidad de quimioluminiscencia. El punto crítico de la técnica radica en la realización de los lavados para eliminar las sondas no hibridadas. La medida debe ser relativizada a la cantidad total de ADN incluido midiendo simultáneamente una sonda inespecífica, como un elemento Alu. Las ventajas frente al *Southern blot* son la importante disminución en la cantidad de ADN requerido (del orden de nanogramos) y que no incluye las regiones subteloméricas [298]

El método actualmente más utilizado sin embargo es la qPCR. Por un lado se encuentra la qPCR que ofrece una medida única promedio de la longitud de los telómeros de todos los cromosomas de la muestra, puesto que la secuencia de los cebadores es complementaria a la propia repetición telomérica. Es una técnica que resulta menos laboriosa que el *Southern blot*, pudiendo aplicarse a un número mayor de muestras. Por otra parte está el método STELA, que combina la técnica qPCR con el conocimiento de la secuencia subtelomérica para amplificar únicamente la región telomérica de un único cromosoma [299], [300]. Sin embargo, estas técnicas tienen una variabilidad mayor y menor reproducibilidad que la técnica de *Southern blot* [301]. En el caso de la qPCR se han descrito diferentes metodologías, que difieren básicamente en los genes de referencia utilizados y la optimización de los parámetros de PCR para los mismos, diferentes reactivos y aparatos de medición [298], [300]. Los genes de referencia más comúnmente utilizados en humanos son el gen de la proteína de ARN ribosómico 36B4 y la albúmina, pero teóricamente podría utilizarse cualquier gen de copia única, a fin de obtener un valor para relativizar la media de la longitud de los telómeros de las diferentes muestras ensayadas. Debido a los problemas para ajustar las variaciones técnicas entre los diferentes pocillos de la PCR se desarrollaron métodos basados en la tecnología multiplex para determinar la longitud de los telómeros y de los genes de referencia en el mismo pocillo, utilizando diferentes fluoróforos [302]. Otra adaptación para solventar este problema ha sido la inclusión de una recta patrón con muestras de ADN cuya longitud de los telómeros es conocida, lo

que permite además de estandarizar entre pocillos proporcionar un valor absoluto en vez de una medida relativa [303].

Por último, se encuentran los métodos de análisis de cromosomas mediante hibridación de sondas fluorescentes *in situ* (Q-FISH). Estas técnicas requieren la disponibilidad de células del tejido que se pretende estudiar. Pese a ser laboriosa, la técnica Q-FISH determina la longitud de todos los telómeros mediante la hibridación de las sondas en los cromosomas de la célula en metafase. El acoplamiento de esta técnica a la citometría de flujo (Flow-FISH) ha permitido disminuir la laboriosidad, si bien sigue siendo compleja y costosa para la aplicación en muchas muestras. Para reducir dicha complejidad Freulet-Marrier *et al.* propusieron una determinación de la longitud de los telómeros de forma indirecta, basada hibridación con la cola de guaninas (T-OLA, *Telomeric-oligonucleotide ligation assay*) que se correlaciona directamente con la longitud de los telómeros y que se aplica directamente a las células en cultivo sin necesidad de la purificación del ADN [298].

El principal problema de la determinación de la longitud de los telómeros es la baja reproducibilidad de los resultados encontrados. Así, *Cawthon y col.* demostraron en 2003 una asociación inversa entre la longitud de los telómeros y la supervivencia en individuos mayores de 60 años, que no fue replicada por *Bischoff y col.* en 2005. en individuos mayores de 73 años. Salvando las diferencias poblacionales, en el primer estudio se utilizó el método de qPCR descrito por el propio *Cawthon* para determinar la longitud de los telómeros, mientras que en el segundo estudio se empleó la técnica de *Southern blot* [48], [304]. Posteriormente tampoco *Martin-Ruiz y col.* fueron capaces de replicar los resultados utilizando qPCR en individuos de más de 75 años y parejas de gemelos, si bien un estudio de 2007 de *Bakaysa y col.* lo confirmaron mediante *Southern blot* la correlación de la longitud de los telómeros con la mortalidad [47], [305]. Tampoco se ha descrito el mismo grado de correlación entre la longitud de los telómeros y la edad con las diferentes técnicas, si bien las diferencias más importantes se deben al rango de edad [306]. Si bien hay estudios metodológicos que indican una alta correlación entre las medidas de longitud de los telómeros

obtenidas con diferentes metodologías [301]; en la práctica, los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación no siempre se confirman.

## Metilación del ADN

En los últimos años se ha producido un gran volumen de datos de metilación basados en arrays que determinan cientos de sitios CpGs distribuidos a lo largo de todo el genoma. Gracias a los datos de individuos sanos de diferentes estudios caso-control, se ha podido estudiar la relación de muchos de estos sitios con la edad cronológica del individuo en el momento de la recogida de la muestra. Según diversos estudios, más de un tercio de los sitios CpG del array 450 o 27K de Illumina tienen niveles de metilación correlacionados con la edad [88], [89], [94]. Como se ha mencionado anteriormente, no se ha determinado el mecanismo específico ni la razón por la cual la metilación de distintos sitios cambia progresivamente con la edad, si bien se ha propuesto un modelo de deriva epigenética.

En base a estos cambios, diversos autores han elaborado modelos de predicción de edad usando el nivel de metilación en una serie de sitios CpG de diferentes genes que conforman los conocidos como relojes epigenéticos o como DmAM (por sus siglas en inglés *DNA methylation age measures*), como nos referiremos a ellos en este trabajo [104], [307]. Los sitios CpG más comúnmente utilizados se encuentran en los genes *CELFB6*, *NHLRC1*, *GLRA1*, *LAG3*, *HTR7*, *SCGN*, *ELOVL2*, *FHL2*, *PENK*, *ASPA* y *EDARADD* con varios sitios CpG que se hipermetilan o hipometilan con la edad [308]. Se han propuesto diferentes DmAM con diferencias en el método de selección de los sitios CpG, tejido sobre el que se aplican, fuente de información utilizada y el número de variables incluidas en el modelo, que resultan en diferencias en la precisión de la estimación de la edad, como se puede ver resumido en la Tabla 2.

A pesar de que los arrays de metilación permiten evaluar múltiples sitios para cada muestra, diversos autores han utilizado pirosecuenciación o técnicas de hibridación con objetivo de buscar cuáles de los sitios CpGs de estos genes generan

mejores modelos de predicción de edad (Tabla 2). Su utilización queda restringida sobre todo al ámbito forense debido a los elevados costes económicos y de tiempo que requiere esta técnica cuando se pretenden analizar múltiples sitios en diferentes amplicones para muchas muestras.

Los niveles de la metilación de los diferentes sitios CpG del genoma son tejido específicos y cambian a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo del individuo. Así, se han desarrollado DmAM específicas para los diferentes tejidos, siendo los más utilizados hasta el momento, sangre y saliva (Tabla2). Sin embargo, recientemente Horvath ha desarrollado una DmAM que permite la estimación de la edad mediante 353 sitios en una gran variedad de tejidos y tipos celulares. Así, con un mismo modelo puede estimarse la edad de múltiples tejidos de un mismo individuo, si bien algunos de ellos muestran pobres correlaciones con la edad [94]. Previamente también la DmAM propuesta por Hannum había mostrado ya buena correlación con la edad en otros tejidos (piel, mama, riñón y pulmón). Sin embargo, ambas DmAM necesitan de un elevado número de sitios CpG, siendo desventajosas para el estudio de muchas muestras (Tabla 2) [88], [94].

Por otra parte, las DmAM que utilizan un número más bajo de sitios CpG pretenden realizar predicciones en un rango muy amplio de edad, que incluye tanto la juventud como la edad adulta. Esto supone mayores errores de predicción en los individuos de mayor edad como ya se ha explicado en el epígrafe anterior. La DmAM de *Horvath y col.* es una excepción, sin embargo, ni los sitios CpG ni los parámetros de esta medida están públicamente disponibles [89].

| Autor           | Público | Nº de CpGs | Modelo        | Tejido           | Técnica de determinación | Tamaño muestral | Rango edad | MAD  | Correlación | Ref.  |
|-----------------|---------|------------|---------------|------------------|--------------------------|-----------------|------------|------|-------------|-------|
| Horvath         | SI      | 353        | Elastic Net   | Varios           | Illumina                 | 8000            | 0-112      | 3.6  | 0.96        | [94]  |
| Wediner 2       | NO      | 102        | R. Lineal     | Sangre           | Illumina                 | 576             | 0-78       | 3.34 | 0.98        | [309] |
| Hannum          | SI      | 71         | Elastic Net   | Sangre           | Illumina                 | 482             | 19-101     | 3.9  | 0.963       | [88]  |
| Florath         | NO      | 17         | R. Lineal     | Sangre           | Illumina                 | 400             | 50-75      | 2.6  | 0.84        | [89]  |
| Shao Hua Yi     | SI      | 8          | LOOCV         | Sangre           | EpiTYPER                 | 65              | 11-72      | -    | 0.918       | [310] |
| Freire-Aradas   | SI      | 7          | R. cuantífica | Sangre           | EpiTYPER                 | 725             | 18-104     | 3.07 | 0.979       | [315] |
| Bocklandt       | NO      | 6          | LOOCV         | Saliva           | Illumina                 | 34 gemelos      | 21-55      | 5.2  | 0.83        | [307] |
| Zbièc-Piekarska | SI      | 5          | Lineal        | Sangre           | Pirosecuenciación        | 300             | 2-75       | 3.4  | 0.94        | [311] |
| Bekaert         | SI      | 4          | R. cuadrática | Sangre y dentina | Pirosecuenciación        | 206             | 0-91       | 3.75 | 0.96        | [312] |
| Yun Huang       | SI      | 4          | R. Lineal     | Sangre           | Pirosecuenciación        | 89              | 9-75       | 7.87 | 0.819       | [313] |
| Soares          | NO      | 3          | LOOCV         | Saliva y sangre  | Pirosecuenciación        | 44              | 5-72       | 6.9  | 0.8         | [212] |
| Weidner 1       | SI      | 3          | R. Lineal     | Sangre           | Pirosecuenciación        | 82              | 0-78       | 5.4  | -           | [309] |

**Tabla 2. DNA methylation age measures (DmAM) ordenadas de mayor a menor correlación con la edad.** De izquierda a derecha las columnas indican: el apellido del primer autor de la publicación donde se presenta la DmAM, la disponibilidad de los parámetros del modelo de predicción de edad biológica, el número de sitios CpG necesarios, el método estadístico utilizado para la predicción, el tejido en el que se ha optimizado el modelo, la técnica mediante la cual se determinan los niveles de metilación de los sitios CpG necesarios, el tamaño muestral utilizado para la optimización de la DmAM, el rango de edad de la población utilizada para la optimización, la MAD (*mean absolute deviation*) o desviación absoluta media del modelo en la cohorte de optimización, la correlación con la edad y la referencia de la publicación.

En resumen, las DmAM disponibles públicamente presentan limitaciones para predecir la edad biológica mediante el uso de un número reducido de CpGs y centrada en un rango de edad adulta. De esta forma, es necesaria la optimización de un modelo que permita realizar predicciones en muchas muestras de forma eficiente en términos de tiempo y costes. La nueva DmAM propuesta en esta tesis está centrada en un rango de edad habitual en los estudios caso-control de diferentes enfermedades habituales en la edad adulta, como lo son las enfermedades reumáticas, utilizando además una tecnología ampliamente disponible en los laboratorios y que permite el análisis de muchas muestras en poco tiempo.

### **Actividad $\beta$ -Galactosidasa**

La determinación de la actividad  $\beta$ -Galactosidasa se considera uno de los biomarcadores tradicionales presentes en las células senescentes de un tejido. Sin embargo, actualmente no existe un consenso a la hora de delimitar las características de las células senescentes y por tanto tampoco se puede considerar este u otros biomarcadores como universales. De esta forma, existen marcadores que reflejan mejor los daños, los cambios en la estructura heterocromática y las modificaciones epigenéticas en el ADN, mientras que otros marcadores se centran en los productos de secreción característicos del fenotipo SASP o en el arresto del ciclo celular [309].

*Dimri y col.* demostraron en 1995 que la enzima  $\beta$ -Galactosidasa se expresaba solo en las células senescentes, y no en las quiescentes, células diferenciadas o células madre [310]. Esto hace posible una detección de este tipo de células mediante la adición de un sustrato, X-gal, que a pH 6.0 adquiere color azul al ser procesado por el enzima  $\beta$ -Galactosidasa [311]. Posteriormente se ha demostrado que este biomarcador aparece tanto en aquellas células con senescencia replicativa como en las que adquieren el estado de senescencia debido a factores extrínsecos como el estrés. Además, mostró una correlación aparente con la edad de los donantes de las células en cultivo que fueron analizadas. Sin embargo, hasta el momento solo un estudio ha

establecido el valor de correlación entre la edad cronológica y la tinción de células senescentes mediante X-GAL. A pesar de que la correlación descrita es de 0.85, hay que destacar que está basada en solo 6 individuos de 10 a 80 años y en un tipo celular muy específico: células de músculo liso de la pared venosa [312].

Se han propuesto otros métodos combinados de varios marcadores de células senescentes, como Ki68 o p16, si bien no existe ningún experimento que demuestre una mejoría en la correlación con la edad [313].

## **5. El envejecimiento en las enfermedades reumáticas**

El envejecimiento es un factor de riesgo y está implicado en el desarrollo de múltiples enfermedades como el cáncer o la aterosclerosis. Sin embargo, no existe un mecanismo mediante el cual se pueda explicar la participación del envejecimiento en estas enfermedades. Se ha hipotetizado que las células desarrollan una hiperactividad para contrarrestar los efectos de la acumulación de daños a medida que envejecen, lo que podría causar este tipo de patologías caracterizadas por la aparición de nuevas células o productos de secreción de las células [7]. También se ha hipotetizado con la acción de alguno de los mecanismos del envejecimiento de forma específica en los tejidos afectados en determinadas patologías, como la artrosis o las enfermedades neurodegenerativas [265], [267].

Existen diversas evidencias de un envejecimiento prematuro en las diferentes enfermedades reumáticas con base autoinmune como en el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjogren y la esclerosis múltiple; pero también en la artrosis y la osteoporosis. Así, algunas enfermedades se desarrollan típicamente a edades en las que el acortamiento telomérico comienza a ser crítico, cincuenta o sesenta años, mientras que otras tienen un desarrollo más temprano [55]. A pesar de que todas ellas afectan al aparato locomotor o musculoesquelético, debido a la heterogeneidad etiológica que presentan debe abordarse su estudio de forma independiente.

## Envejecimiento en la artrosis

La artrosis (en inglés *osteoarthritis*, *OA*) es una enfermedad crónica y degenerativa que afecta a la articulación en su conjunto, pero especialmente al cartílago articular, produciendo dolor, que se agrava con el uso y con la proliferación de hueso subcondral. Afecta generalmente a las rodillas, cadera, dedos de las manos, dedo gordo del pie y también a la columna cervical y lumbar y a algunas articulaciones del hombro. En España, esta enfermedad afecta al 10% de la población, representando casi la cuarta parte del total de los pacientes de enfermedades reumáticas. En cuanto a la prevalencia, difiere según la articulación, siendo del 10.2% para la artrosis de rodilla y de un 6.2% para la artrosis de mano [314]. La artrosis es la segunda causa de incapacidad laboral en España, tanto permanente como temporal, consumiendo una parte importante de los recursos sanitarios y reduciendo la calidad de vida de los pacientes [315].

Los factores de riesgo principales de la artrosis son el sexo femenino, sobre todo en el caso de la artrosis de rodilla y mano; la obesidad, principalmente en la artrosis de rodilla y la cadera y la edad, que es el factor de riesgo más fuertemente correlacionado con todos los tipos de artrosis. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la enfermedad se desarrolla en mayor medida en individuos a partir de los 50 años son todavía desconocidos [314], [316]. En el caso del sexo femenino, tras la menopausia descienden los niveles de estrógenos, que influyen no solo en la síntesis de proteoglicanos sino también en la masa muscular. Además, los traumatismos, la sobreutilización de la articulación en determinadas profesiones y algunas enfermedades que modifican la estructura de la articulación contribuyen al desencadenamiento y progresión de la artrosis, siendo considerada en estos casos como artrosis secundaria. Por último, existe un componente genético que da lugar a una predisposición familiar de la enfermedad. Esta amplia variedad etiológica ha generado diferentes clasificaciones, destacando la de *Herrero-Beaumont y col.*, que separa los tres factores de riesgo más importantes: artrosis de tipo I, de causa genética;

artrosis de tipo II, hormono dependiente y artrosis de tipo III, relacionada con la edad [317].

Fisiopatológicamente, existen diversos cambios tanto en el cartílago como en el hueso y el tejido sinovial de la articulación implicados en el desarrollo de la artrosis, si bien nos centraremos en aquellos que están relacionados con la edad. El envejecimiento contribuye a la patogenia a diversos niveles, como son la apoptosis de los condrocitos, el incremento del estrés oxidativo, la pérdida de matriz extracelular y la acumulación de células senescentes.

En el cartílago es un tejido con una baja tasa de recambio celular, puesto que los condrocitos son células muy diferenciadas que sintetizan la matriz celular y que no se dividen para regenerar el tejido. Los condrocitos son células de vida larga, con baja capacidad para dividirse y carecen de un pool de células progenitoras que puedan regenerar el tejido mediante diferenciación [318]. A medida que el individuo envejece tiene lugar un aumento de la apoptosis de los condrocitos, tanto en cartílago de pacientes con artrosis como en el cartílago macroscópicamente conservado de individuos entre 40 y 60 años. Así, se pierden un 50% de los condrocitos entre los 20 y los 90 años en la zona superficial del cóndilo femoral [319]. La muerte celular de los condrocitos puede deberse a la pérdida de capacidad para responder a los factores de crecimiento, que contribuyen a desequilibrar la actividad anabólica y catabólica [320]. Existen estudios que demuestran el mecanismo mediante el cual el incremento de especies reactivas del oxígeno (ROS) activan la apoptosis en los condrocitos y como los cuerpos apoptóticos propician la calcificación del cartílago, característica que puede apreciarse en el cartílago tanto durante el envejecimiento como en la artrosis más avanzada [321].

Puesto que los condrocitos se encuentran en un ambiente carente de vascularización, con bajos niveles de oxígeno y nutrientes, su metabolismo se basa principalmente en la glucólisis. Sin embargo, los cambios en la irrigación del hueso subcondral, principalmente debidos a factores mecánicos, y en la tensión parcial del

oxígeno en el líquido sinovial, pueden variar las condiciones de oxígeno que llega al cartílago [322]. Si esto ocurre, los condrocitos generan niveles anormales de ROS, y se destruyen no solo las membranas celulares sino también la matriz extracelular, produciéndose el daño articular. Además, se ha descrito que el aumento de ROS genera una respuesta proinflamatoria que a su vez retroalimenta positivamente la generación de más estrés oxidativo [323]. Por otra parte, el estrés celular que conlleva la presión mecánica a la que están sometidos los condrocitos genera daños en la mitocondria, que es la fuente principal de ROS y promueve la apoptosis. Sin embargo, el cartílago no puede responder a este estrés mediante el incremento de agentes antioxidantes tal y como ocurre en otros tejidos más vascularizados [316]. Se cree que ciertos grupos mitocondriales podrían estar ligados a una mayor producción de ROS mitocondrial y por ello contribuir en mayor medida que otros al desarrollo de la artrosis, si bien esta teoría no está totalmente establecida [324], [325].

Con la edad, la matriz extracelular que conforma el cartílago articular cambia en espesor y composición, siendo la parte superficial la zona más afectada y donde se encuentran los primeros signos de la artrosis [326]. Esta zona superficial es la que está más expuesta al impacto mecánico, pero también a la mayor exposición a los agentes proteolíticos presentes en el líquido sinovial [327]. Además, las propiedades biomecánicas de la matriz extracelular se ven alteradas por la acumulación de productos de glicosilación avanzada en las moléculas de colágeno [293].

Existe un decaimiento edad dependiente de la capacidad de los condrocitos de proliferar y sintetizar matriz extracelular, si bien su capacidad para producir mediadores proinflamatorios y enzimas de degradación se mantiene. A medida que los condrocitos se vuelven senescentes aumenta la secreción de los factores IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, GRO $\alpha$ , MCP-2 y MMP-3, característicos del fenotipo SASP. De esta forma los condrocitos senescentes contribuyen al ambiente proinflamatorio y a la elevada producción de metaloproteinasas que destruye la matriz extracelular y agrava las lesiones artrósicas [222].

La aparición de condrocitos senescentes probablemente se deba a una respuesta al estrés celular inducido por ROS y no a la senescencia replicativa, dada su baja tasa de división. Sin embargo, se ha observado un aumento de la proliferación de los condrocitos en la artrosis, pudiendo distinguirse agrupaciones de clones en áreas que presentan fibrosis [328]. Las células de estos grupos presentan marcadores de células progenitoras y un amplio espectro de marcadores de activación y diferenciación de condrocitos. Esto se ha postulado como un intento de reparación del tejido dañado, pero más que contribuir a su reparación, parece que da lugar a la expresión aberrante de genes observada durante la artrosis [329]. En estas zonas de proliferación se produce un acortamiento telomérico mayor y una acumulación de células senescentes [56], SA- $\beta$ gal positivas, que llevan a pensar que la senescencia de los condrocitos es una consecuencia, más que una causa, de la artrosis [56], [330].

A pesar de que los condrocitos muestran una baja tasa de división celular, se ha demostrado un acortamiento telomérico durante el envejecimiento en estas células. Se cree que esta erosión de los telómeros se debe mayoritariamente a factores de estrés, como la hipoxia y la presión mecánica a la que están sometidas estas células, más que al número de divisiones a lo largo de la vida del individuo [331]. Varios estudios han demostrado un acortamiento de los telómeros tanto en condrocitos de pacientes con artrosis respecto a controles, como en el cartílago in vivo, mediante qPCR, STELA y Q-FISH. Además, los telómeros significativamente más cortos se encontraron en la zona lesionada del cartílago de los pacientes con artrosis de rodilla, en comparación con las regiones distales no lesionada [40], [266].

Por todo lo anteriormente descrito, parece evidente que el cartílago articular sufre un proceso de envejecimiento que altera su capacidad de respuesta a daños e incrementa su vulnerabilidad. Aunque este envejecimiento no puede considerarse como un agente causal de la artrosis, los estudios apuntan a que contribuye al desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, la edad es un agente que actúa a nivel de todo el organismo y un envejecimiento prematuro podría afectar a otros órganos y tejidos en los individuos con artrosis, manifestándose como un componente sistémico.

Un componente de envejecimiento sistémico prematuro en la artrosis, estaría en consonancia con ciertas características observadas en estudios epidemiológicos. Así, se sabe que los pacientes con artrosis tienen mayor prevalencia de comorbilidades de edad avanzada, discapacidad y mortalidad. Varios estudios apuntan a un incremento del riesgo, de hasta el 26%, de padecer enfermedades cardiovasculares tras haber sufrido una cirugía de reemplazamiento articular por artrosis [332]. En la misma línea, un metaanálisis de 49 estudios revela la relación entre la artrosis y la diabetes mellitus, mostrando que los pacientes con artrosis tienen un riesgo 1,41 veces mayor de sufrir diabetes que los individuos sin artrosis [333]. Además, los pacientes con artrosis tienen mayor riesgo de desarrollar demencia y enfermedad de Parkinson [334]. Por último, existe un incremento en el riesgo de mortalidad de los pacientes con artrosis de rodilla y/o cadera en comparación con la población general, sobre todo debido a demencia y a enfermedades cardiovasculares [335]. Sin embargo, también existen algunos estudios epidemiológicos que no revelan un incremento en la mortalidad ni en las comorbilidades anteriormente descritas [336], [337]; por lo cual, un envejecimiento sistémico como causa de la aparición o desarrollo de la artrosis solamente puede considerarse una hipótesis.

No existen suficientes estudios de biomarcadores de edad en otros tejidos de la articulación, ni a nivel sistémico en los pacientes con artrosis que puedan apoyar o descartar esta hipótesis. Solamente un estudio en sangre ha encontrado acortamiento telomérico en 160 pacientes con artrosis en la mano en comparación con 926 controles sanos [58]. Además, la erosión de los telómeros se correlaciona con la severidad de la artrosis de mano aunque estos hallazgos no han sido confirmados de forma independiente y se han observado resultados contrarios en un estudio de menor tamaño (39 pacientes vs 20 controles) [40]. También un estudio reciente encontró niveles de pentosidina menores en el suero y hueso de pacientes con artrosis respecto a los controles con fractura, todo lo contrario a lo que cabría esperar si el envejecimiento actuase de forma sistémica [338].

En conclusión, recientemente se han revisado los mecanismos del envejecimiento que afectan al cartílago, definiendo como condrosenescencia al proceso dependiente de la edad a través del cual se deteriora el condrocito articular ligado a factores intrínsecos, como la división de los condrocitos, y a factores extrínsecos, como el estrés celular. Sin embargo, apenas existen estudios sobre los efectos del envejecimiento en otros tejidos articulares o a nivel sistémico que puedan ayudar a aclarar el papel de la edad como factor de riesgo de la artrosis [155], [339].

### **Envejecimiento en la artritis reumatoide**

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica que cursa con dolor, rigidez, hinchazón y pérdida de la movilidad de las articulaciones de forma simétrica, especialmente de manos, pies, muñecas, hombros, codos, rodillas y cadera. También existen manifestaciones extra-articulares que pueden afectar al pulmón, corazón o el riñón, en algunos pacientes. En España, más de 200.000 personas padecen artritis reumatoide y cada año se diagnostican unos 20.000 nuevos casos [314].

La artritis reumatoide se considera una enfermedad sistémica debido a su base autoinmune, si bien en algunos pacientes las únicas dianas que manifiestan síntomas clínicos son las articulaciones [314], [340]. La presencia de autoanticuerpos como el factor reumatoide y los anticuerpos anti-péptidos citrulinados (anti-CCP) es uno de los factores que diferencian la artritis reumatoide de otras enfermedades reumáticas que cursan también con inflamación de las articulaciones. A pesar de que se trata de una enfermedad autoinmune, un 20% de los pacientes con artritis reumatoide son seronegativos, no se ha detectado hasta el momento ningún autoanticuerpo, y representan un grupo con asociaciones genéticas y algunas características clínicas claramente diferentes al resto de pacientes con AR [340].

Entre los factores de riesgo de la artritis reumatoide se encuentra el sexo, la etnia, algunos factores genéticos y la edad. Así, es una enfermedad de 2.5 a 3 veces

más frecuente en mujeres que en varones, en caucásicos y en individuos entre los 45 y los 55 años. Existen más de 100 polimorfismos asociados con la susceptibilidad a padecer artritis reumatoide, destacando el sistema del antígeno leucocitario humano (HLA). También son factores de riesgo la obesidad y el consumo de tabaco [341].

Si bien la edad no representa un factor de riesgo tan importante como en otras enfermedades inflamatorias, se sabe que el riesgo a padecer artritis reumatoide se incrementa progresivamente desde los 45 hasta los 70 años [342]. Así, otras enfermedades autoinmunes órgano-específicas como la diabetes mellitus se presentan en edades muy tempranas, mientras que la artritis reumatoide suele presentarse a edades más avanzadas como ocurre en la arteritis de células gigantes, otra enfermedad inflamatoria crónica [343]. En los últimos años se ha propuesto que la inmunosenescencia podría ser la explicación más plausible para el papel de la edad como factor de riesgo en la artritis reumatoide, concordando con su aparición más tardía respecto a otras enfermedades autoinmunes.

La inmunosenescencia es el conjunto de mecanismos de envejecimiento que afectan específicamente al sistema inmune, tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa, y que dan lugar a cambios en los procesos de formación de nuevas células sanguíneas y a la respuesta de las mismas frente a los agentes infecciosos. Los cambios más importantes observados en la artritis reumatoide se producen a nivel de las células B, macrófagos y células T.

Las células B juegan un papel muy importante en la patogénesis de la AR tanto como células presentadoras de antígenos como por la producción de autoanticuerpos. El envejecimiento disminuye tanto al número como a la funcionalidad de este tipo de células. Sin embargo, en pacientes con AR de reciente comienzo no se ha visto un número significativamente menor de células B que en controles de la misma edad. Recientemente, se han identificado un nuevo subtipo de células B relacionadas con el envejecimiento y definidas como  $CD19^+CD11c^+CD21^-$ , que se encuentran en algunas mujeres con AR. Este tipo de células están incrementadas en cepas de ratones

propensos a sufrir eventos autoinmunes y son las principales productoras de autoanticuerpos [344], [345]. Además, se ha descrito un descenso de las células B productoras de IL-10, una de las principales interleuquinas antiinflamatorias [346].

Los monocitos  $CD14^{dim}CD16^{bright}$  se consideran el subtipo senescente de monocitos debido a su menor longitud de los telómeros y positividad para la  $\beta$ -galactosidasa en comparación con los monocitos clásicos ( $CD14^{bright}CD16^{-}$ ). Además, estos monocitos senescentes expresan citoquinas proinflamatorias y receptores de quimioquinas que facilitan su migración a tejidos. Se han encontrado incrementados en pacientes ancianos con aterosclerosis y pacientes de AR en comparación con sujetos jóvenes [347],[348]. Existe también otra subpoblación de monocitos que expresan CD56, típico de las células NK, y que también se incrementan con la edad. Estos monocitos  $CD14^{bright}CD56^{+}$  producen elevadas cantidades de citoquinas y ROS. Se han encontrado expandidos en pacientes de AR de menos de 40 años en relación a controles sanos pero su abundancia tampoco se correlaciona con la duración de la enfermedad, el tratamiento o los niveles de PCR [349].

Por último, las células T sufren también cambios durante el envejecimiento. La característica más notable de estas células con el envejecimiento es la expansión clonal de las  $CD4^{+}$  y sobre todo de las  $CD8^{+}$  que carecen de CD28. Este receptor es necesario para la activación eficiente de las células T y por ello su proliferación y activación disminuyen progresivamente con la edad, causando la adquisición de características de células NK en las primeras y la pérdida de la función reguladora en las segundas [350], [351]. En un principio, se encontró una expansión de las células  $CD4^{+}CD28^{-}$  en los pacientes con enfermedades crónicas autoinmunes, incluidos los de AR y de AR de reciente comienzo, sobre todo aquellos portadores del alelo de susceptibilidad HLA-DRB1\*04, que parecía asociada a un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias y la citotoxicidad. Además, las células  $CD4^{+}CD28^{-}$  derivadas de células sanguíneas periféricas de pacientes con AR producen mayor cantidad de TNF y de IFN que las  $CD4^{+}CD28^{+}$  [352]. Sin embargo, posteriormente se observó que esta expansión clonal está presente solamente en los individuos expuestos al

citomegalovirus humano. Además, la capacidad de estas células  $CD4^+CD28^-$  de producir citoquinas está directamente relacionada con la exposición al virus y no parece tener relación con los niveles de anti-CCP o el grado de erosiones en los pacientes con AR [353].

Además de la inmunosenescencia, también se han visto exacerbados otros mecanismos del envejecimiento en pacientes de AR. Así, los pacientes con artritis reumatoide presentan cambios epigenéticos, en la homeostasis proteica y en la senescencia, tanto a nivel articular como sistémico. Algunos de estos cambios relacionados con el envejecimiento se han descrito también en pacientes con AR de reciente comienzo, apuntando a un posible papel causal en el desarrollo de la enfermedad, independiente de los daños y el estrés celular producidos por la respuesta autoinmune [173].

Los sinoviocitos de AR presentan alteraciones epigenéticas importantes como una hipometilación global [354], una hipometilación de los elementos LINE-1 y promotores DR-3, un incremento de la actividad HDAC y una sobreexpresión de sirtuina 1. Además, la presencia de TNF-alfa incrementa la inducción de HDAC y sirtuina 1 [355], [356]. En las células sanguíneas de los pacientes de AR también se han observado niveles incrementados de actividad HDAC pero no cambios en la sirtuina 1 [357]. Existen también otras hipometilaciones que juegan un papel importante en la respuesta autoinmune, como la hipometilación de un sitio CpG en el promotor de la IL-6, que se da con frecuencia en las células sanguíneas de pacientes con AR en comparación con los controles sanos, y la hipometilación que da lugar a la aparición de las  $CD4^+CD28^-$ , pero en estos casos no se ha establecido ninguna vinculación con la edad [109], [352].

En cuanto a la homeostasis proteica, se ha visto incrementada la expresión de las proteínas del sistema de respuesta al estrés térmico tanto en células sanguíneas como en el tejido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide. Además, varios estudios apuntan a las chaperonas como autoantígenos de las células T y B en la AR, y se han encontrado autoanticuerpos específicos contra proteínas citrulinadas de este

sistema de respuesta al estrés. Consecuentemente con el incremento de estas proteínas se ven incrementados los niveles de autofagia en los fibroblastos de pacientes de AR, si bien su papel en la apoptosis o la supervivencia de la célula es aún controvertido [156], [157].

Los marcadores de senescencia celular como p53, p16 y  $\beta$ -galactosidasa también se han visto incrementados en el tejido sinovial tanto de AR establecida como de reciente comienzo e incluso se han visto variantes mutadas de p53 que favorecen la proliferación de los fibroblastos y la producción de IL-6 [229]. Diversos estudios apuntan a que la senescencia afecta también a las células madre hematopoyéticas de la médula ósea durante la AR. Así, estas células tienen menor capacidad para formar colonias que las derivadas de controles sanos y mayor tasa de apoptosis. Sin embargo, esta senescencia de las células madre es independiente de la actividad de la enfermedad y su duración, e incluso indiferente en pacientes tratados y no tratados si bien la elevación de TNF- $\alpha$  en la médula ósea parece incrementar la apoptosis de las HSC [230]. Además, los fibroblastos derivados de pacientes de AR que se vuelven senescentes tras varios pases celulares producen significativamente mayor cantidad del IL-6, IL-8, VEGF y PGE2 en respuesta a IL-1 $\beta$  que los de pases tempranos, típicamente relacionados con el fenotipo SASP [257].

Aunque es más conocida la relación entre la inmunosenescencia y la artritis reumatoide, existen otros mecanismos del envejecimiento presentes en la AR llevan a pensar que un posible envejecimiento prematuro pueda jugar un papel en el desarrollo de la enfermedad. Entre la búsqueda de la confirmación de esta hipótesis se encuentran algunos trabajos sobre cómo los tratamientos anti-inflamatorios revierten este fenotipo envejecido. Así, se ha demostrado in vitro y en algunos estudios in vivo que el tratamiento con anti-TNF revierte el fenotipo CD28 negativo de las células T [358], [359]. Además, se ha observado un descenso de los niveles de apoptosis de las células HSC y mayor formación de colonias con los tratamientos que bloquean el TNF mientras que no se ha observado ningún efecto en pacientes tratados con MTX [173].

Sin embargo, se ha dedicado un esfuerzo considerablemente menor a la estimación de la magnitud de este envejecimiento prematuro en la artritis reumatoide. Así, solo unos pocos estudios abordan este punto, mediante la medición del acortamiento telomérico y los productos de glicosilación avanzada.

En cuanto al acortamiento telomérico existen resultados contradictorios. Por una parte se encuentran los estudios que abordan el acortamiento telomérico en las células madre hematopoyéticas, como evidencia del proceso de inmunosenescencia. Así, *Kastrinaki y col.* demostraron un acortamiento telomérico mayor en células mesenquimales de la médula ósea de pacientes con artritis, si bien en controles sanos también se observó un acortamiento progresivo desde los 30 hasta los 70 años [360]. También se observó una erosión de los telómeros mayor en células hematopoyéticas CD34+ de pacientes con AR [230]. Por otra parte, se ha descrito un acortamiento telomérico tanto en sangre completa como en poblaciones sanguíneas aisladas, células T y granulocitos [59]–[61]. Sin embargo, en otros estudios no se han encontrado diferencias significativas o incluso los pacientes con artritis reumatoide mostraron telómeros más largos que los controles [62], [63]. Además, existen discrepancias en cuanto a la magnitud del acortamiento, que van desde los 15 años hasta los 60 años [361], [362]. En cualquier caso, no parece existir una relación clara entre la longitud de los telómeros y la duración o la actividad de la enfermedad [361]. En esta línea, parece existir una relación entre determinados alelos del HLA, como el DR1 y el DR4, y el acortamiento telomérico, lo que podría implicar una relación indirecta entre el acortamiento telomérico y el desarrollo de la AR [363].

Tampoco las publicaciones que analizan los productos de glicosilación avanzada han centrado su atención en la magnitud del efecto ni su relevancia en el envejecimiento prematuro en la AR. En las primeras aproximaciones se trató de abordar el papel de los AGEs en la inmunogenicidad y su presencia y correlación en suero, líquido sinovial y orina [292]. Cabe destacar que muchos de los artículos tienen como objetivo la comprobación de la posible utilidad de estos productos de glicosilación como biomarcadores de la enfermedad, analizando su relación con diferentes marcadores de inflamación y características clínicas de la AR [364], [365].

Sin embargo, existen resultados controvertidos al respecto, puesto que en algunos estudios no se observa correlación con las variables clínicas [366]. Finalmente, los estudios más recientes han descrito el efecto del tratamiento con metotrexato y los tratamientos biológicos en el nivel sérico de los AGEs, donde parece claro que los pacientes con AR tratados presentan niveles menores que los pacientes no tratados [367], [368].

En resumen, existen evidencias de un envejecimiento prematuro en la artritis reumatoide, especialmente en aquellos aspectos relacionados con la inmunosenescencia, pero no se ha podido esclarecer su importancia debido a las discrepancias en relación con la duración de la enfermedad o las características clínicas de los pacientes y a la magnitud de dicho envejecimiento.

En esta introducción se ha descrito brevemente la importancia de los mecanismos del envejecimiento en las enfermedades reumáticas, principalmente la artrosis y la artritis reumatoide, objeto de este estudio. En cuanto a la artrosis, existen evidencias que apuntan a un posible papel del envejecimiento prematuro como factor de riesgo en su desarrollo, si bien no está claro si su implicación se restringe a nivel articular, o si podría tratarse de un envejecimiento sistémico. En la artritis reumatoide, a pesar de que existen diversos estudios que sugieren una implicación de la inmunosenescencia, no se ha abordado el estudio de la magnitud y la relevancia de un envejecimiento prematuro en la enfermedad. Con la aparición de un nuevo biomarcador de edad biológica, las “*DNA methylation Age Measures*” (DmAM), se abre una puerta para poder abordar las cuestiones no resueltas sobre el papel del envejecimiento en las enfermedades reumáticas. Además, este nuevo biomarcador basado en cambios en los niveles de metilación del ADN permite estudiar posibles diferencias con el acortamiento telomérico, hasta ahora el biomarcador de edad más utilizado. Abordar el estudio de la edad biológica como factor de riesgo desde una nueva perspectiva, los cambios de metilación, es importante en tanto en cuanto existe una amplia variedad de mecanismos implicados en el envejecimiento, con una regulación compleja y sinérgica entre ellos.

## OBJETIVOS

1. Desarrollar y validar una medida de edad biológica basada en la metilación del ADN que permita el estudio de muchas muestras de sangre utilizando PCR y un secuenciador capilar.
2. Analizar los componentes sistémico y local del envejecimiento prematuro en los pacientes con artrosis mediante biomarcadores de edad biológica aplicados a muestras de sangre, hueso y cartílago.
3. Analizar el posible envejecimiento acelerado en la sangre de los pacientes con artritis reumatoide mediante biomarcadores basados en la metilación del ADN o con el acortamiento de los telómeros.





# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Colecciones de muestras

### Colecciones de muestras para la optimización de la DmAM de 8CpGs

Como cohorte de entrenamiento para optimizar la estimación de edad en sangre de adultos utilizamos 390 individuos mayores de 20 años obtenidos de Weidner et al [369] (Tabla 3). Este set de datos consiste en muestras de ADN genómico de sangre obtenidas de caucásicos de 20 a 78 años (media=61.2; DS=11.6) con un 96.7% de mujeres. Todos los perfiles de metilación se generaron en array de Illumina Human Methylation 27 BeadChip y están disponibles al público en la base de datos GEO bajo los códigos GSE19711, GSE20242, GSE20236, GSE23638.

Como cohorte de validación 1 se utilizaron los datos de metilación de los controles disponibles en GSE42861 [370], cuyas características se detallan en la Tabla 3. La cohorte se compone de individuos recogidos entre mayo de 1996 y febrero de 2001 en el centro y sur de Suecia como controles poblacionales para el estudio de la artritis reumatoide, por lo que fueron excluidos aquellos que presentan síntomas de la misma. Todos los sujetos del estudio cumplimentaron un amplio cuestionario con información detallada de hábito tabáquico [371]–[373].

Para analizar la influencia de los tipos celulares sanguíneos principales se utilizó una cohorte de 92 controles [374]. Esta cohorte de voluntarios sanos de Vancouver de entre 24 a 45 años (media= 33.03, DS=5.03) tiene un 62.0% de mujeres (Tabla 3). El ADN se obtuvo de células mononucleares de sangre periférica y los valores de metilación se obtuvieron mediante un array de Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip disponible en GSE37008. Además, el diseño del estudio incluyó el análisis de sangre en el momento de la extracción mediante un sistema Advia 70 (Siemens Medical) que permitió determinar el recuento de células totales, monocitos, linfocitos, neutrófilos, basófilos y eosinófilos de cada muestra.

| <b>Colección</b>     | <b>Aplicación</b>                   | <b>Estudio</b>           | <b>N</b> | <b>Edad (DS)</b> | <b>Rango de edad</b> | <b>% Mujeres</b> |
|----------------------|-------------------------------------|--------------------------|----------|------------------|----------------------|------------------|
| <b>Entrenamiento</b> | Entrenamiento                       | Weidner CI <i>et al.</i> | 390      | 61.2 (11.6)      | 20 a 78              | 96.7             |
| <b>Validación 1</b>  | Comparación de DmAMs                | Liu Y <i>et al.</i>      | 335      | 52.8 (11.5)      | 20 a 70              | 71.3             |
| <b>Validación 2</b>  | Estudio de la composición sanguínea | Lam L <i>et al.</i>      | 92       | 52.8 (11.5)      | 25 a 45              | 71.3             |
| <b>Validación 3</b>  | Validación por MS-SNuPE             | Presente estudio         | 557      | 65.9 (10.0)      | 45 a 89              | 51.4             |

**Tabla 3. Descripción detallada de las colecciones de muestras utilizadas en este estudio. N= tamaño muestral, DS = Desviación standard**

Finalmente, se utilizó una cohorte combinada de controles utilizada para estudios de pacientes con artrosis y con artritis para la validación del modelo mediante datos de metilación obtenidos por MS-SNuPE. Las características de esta cohorte se detallan en la Tabla 3 y los procedimientos de recolección pueden verse en los subsiguientes apartados de colecciones de muestras utilizadas para los análisis de artrosis y artritis reumatoide.

### **Colección de muestras utilizadas para el análisis de artrosis**

#### **A. Muestras de sangre**

Se utilizaron un total de 890 muestras de individuos con ascendencia española (Tabla 4). Se recogieron los consentimientos informados y la utilización de ADN en el estudio fue aprobada por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC), tal y como se detalla en [375]. Esta colección de muestras incluye 182 controles recogidos en el momento de la urografía intravenosa que no muestran signos ni síntomas de artrosis en la exploración de ambas manos, en el cuestionario general que contestan los pacientes, ni en las radiografías de cadera o columna vertebral. Los 708 individuos restantes son pacientes con OA primaria según el criterio de un reumatólogo que les

ha evaluado y revisado los datos de su historia clínica. Los pacientes con artrosis en las rodillas (229) y en la cadera (273) se seleccionaron en el momento de la cirugía de remplazamiento articular, con entre 55 y 75 años. Los pacientes con artrosis de mano, 206, se seleccionaron en la Unidad de Reumatología por el cumplimiento de los criterios de clasificación del American College of Rheumatology (ACR) para artrosis de mano [376]. Antecedentes de inflamación, infección, trauma o patologías congénitas se consideraron criterios de exclusión, así como las lesiones debidas a depósitos de cristales de pirofosfato de calcio y la osteonecrosis. La obesidad mórbida y la actividad ocupacional de los pacientes no se tuvieron en cuenta como criterios de exclusión.

## **B. Muestras de tejido**

Se obtuvieron los valores  $\beta$  de metilación para los 353 sitios CpG necesarios para realizar la predicción de edad biológica mediante el modelo de Horvath [94] a partir de diversos estudios de metilación realizados en hueso y en cartílago [377]–[380] (Tabla 3). Las muestras de hueso que se habían utilizado corresponden a 45 controles y 33 pacientes con artrosis en la cadera. Los controles correspondían a tejido de la cabeza femoral de 34 sujetos con fractura de cadera debida a osteoporosis y 7 cadáveres, todos ellos sin lesiones macroscópicas compatibles con artrosis [377]. Las piezas se obtuvieron evitando las regiones de hueso subcondral y las regiones fracturadas. Se excluyeron los pacientes con fracturas debidas a traumas severos o enfermedades causales de osteoporosis o artrosis secundaria. También, se incluyeron los datos de otras cuatro muestras de hueso de cadáveres que carecían de información clínica y de localización detallada del tejido [377]. Las piezas de hueso de los 33 pacientes con artrosis de cadera se obtuvieron de la cabeza femoral en el momento de la cirugía de reemplazamiento articular debido a artrosis primaria [377].

| Tejido    | Estudio  | Condición         | N     | Edad Media | Rango Edad | DS    | Mujeres % |
|-----------|--|-------------------|-------|------------|------------|-------|-----------|
| Sangre    | Presente estudio   | Controles         | 182   | 60.70      | 45 a 88    | 11.51 | 46.70     |
|           |  | Artrosis Mano     | 206   | 60.58      | 32 a 88    | 10.06 | 88.35     |
|           |  | Artrosis Rodilla  | 229   | 67.66      | 55 a 78    | 5.63  | 82.09     |
|           |  | Artrosis Cadera   | 273   | 68.38      | 55 a 84    | 5.50  | 59.70     |
| Cartílago | Fernández-Tajes J <i>et al</i> , Ann Rheum Dis 2014; 73:668        | Controles Rodilla | 18    | 59.28      | 40 a 79    | 10.83 | 33.33     |
|           |  | Artrosis Rodilla  | 29    | 68.52      | 54 a 79    | 7.25  | 69.00     |
|           | Aref-Eshghi E <i>et al</i> . BMC Musculoskelet Disord 2015; 16:287 | Artrosis Rodilla  | 6     | 65.35      | 54 a 78    | 10.63 | 100.00    |
|           |  | Controles Cadera  | 10    | 79.37      | 63 a 95    | 11.38 | 90.00     |
|           |  | Artrosis Cadera   | 7     | 60.93      | 41 a 80    | 14.29 | 100.00    |
|           | Lokk K <i>et al</i> , Genome Biol 2014; 15:R54                     | Controles         | 3     | 49.00      | 40 a 54    | 7.81  | 0.00      |
| Controles |  | 4                 | 51.75 | 40 a 60    | 8.42       | 25.00 |           |
| Hueso     | Delgado-Calle J <i>et al</i> , Arthritis Rheum 2013; 65:197        | Cadáveres Cadera  | 7     | 80.29      | 69 a 92    | 8.08  | 100.00    |
|           |  | Fracturas Cadera  | 34    | 80.68      | 65 a 104   | 7.11  | 100.00    |
|           |  | Artrosis Cadera   | 33    | 75.42      | 58 a 89    | 6.74  | 100.00    |

**Tabla 4. Descripción detallada de las colecciones de muestras utilizadas en el estudio de envejecimiento de pacientes con artrosis y controles.**

Las muestras de cartílago utilizadas provenían de 31 controles y 36 pacientes con artrosis. Como controles, se utilizó el cartílago de la meseta tibial de 18 cadáveres sin signos macroscópicos de artrosis [378], y la cabeza femoral de 10 pacientes con fractura de cadera sin evidencias macroscópicas ni microscópicas de artrosis [380].

Además, se añadieron otras 3 muestras de cartílago de cadáveres sin información clínica ni de la articulación de procedencia [379]. Se utilizaron 29 muestras de cartílago artrósico procedentes de la meseta tibial de pacientes con artrosis severa en la rodilla [378], [380] y 7 cabezas femorales de artrosis severa en la cadera [380], todas obtenidas en el momento de la cirugía de reemplazamiento articular.

Los datos de metilación se obtuvieron tanto del array Human Methylation 27 BeadChip [377], [378], como del Human Methylation 450 K Bead-Chip (Illumina, San Diego, California, EEUU) [379], [380]. Estas muestras se obtuvieron con el consentimiento informado de los donantes y la aprobación de los comités éticos correspondientes tal y como se detalla en las publicaciones originales [377]–[380].

### **Colección de muestras utilizadas para el análisis de artritis reumatoide**

La colección de descubrimiento consta de 360 muestras utilizadas para el estudio de la AR que cumplen los criterios del American College of Rheumatology (ACR) de 1987 [381], y 375 controles sanos pareados por edad de 54 a 89 años (Tabla 5). Todos los participantes firmaron un consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC) [382]. Las características clínicas detalladas de los pacientes con AR y controles se encuentran en la Tabla 4. Los datos de autoanticuerpos y HLA-DRB1 fueron obtenidos previamente [383]. Tanto pacientes como controles fueron reclutados entre 2001 y 2009 manteniéndose el seguimiento hasta la actualidad.

Como cohorte de replicación utilizamos la colección EIRA [370]. Este estudio incluyó residentes de entre 18 y 70 años (media=51.2 DS=12.1 para AR y media=52.8; DS=11.5 para controles) de la zona centro y sur de Suecia con AR de reciente comienzo (menor a 1 año). Para cada paciente se incluyó un control seleccionado aleatoriamente del registro nacional sueco pareado por sexo, edad, hábito tabáquico y zona geográfica. Finalmente la cohorte incluyó un 71% de mujeres y alrededor de un 70% de

fumadores o ex-fumadores. Los pacientes fueron incluidos por un reumatólogo en los 2 meses siguientes a la aparición de los primeros síntomas articulares según los criterios ACR de 1987. Todos los pacientes fueron anti-CCP positivos debido al diseño del estudio. Se recogió el ADN en la primera visita al departamento de reumatología, antes de la administración de fármacos modificadores de la enfermedad. Tanto pacientes como controles se reclutaron entre mayo de 1996 y febrero de 2001 [371]–[373], [384].

|   | <b>Pacientes AR</b> | <b>Controles</b> |
|---|---------------------|------------------|
| <b>Nº muestras</b>                                | 360                 | 375              |
| <b>Mujeres (%)</b>                                | 73,61%              | 53,60%           |
| <b>Edad Media (DS)</b>                            | 68.40 (8,00)        | 68.49 (8,00)     |
| <b>Edad Rango</b>                                 | 54-89               | 54-89            |
| <b>Epítipo compartido (portador %)</b>            | 52,92%              | 28,85%           |
| <b>Fumador (%)</b>                                | 17,39%              |                  |
| <b>Anti-CCP (%)</b>                               | 64,29%              |                  |
| <b>Factor reumatoide (%)</b>                      | 59,63%              |                  |
| <b>Erosiones (%)</b>                              | 67,08%              |                  |
| <b>Edad media de inicio de la enfermedad (DS)</b> | 52.21 (13.23)       |                  |
| <b>Duración media de la enfermedad (DS)</b>       | 16.13 (11.36)       |                  |

**Tabla 5. Características principales de la colección de muestras de pacientes con AR utilizadas en este estudio. DS = Desviación estándar.**

## 2. Métodos experimentales

### Ensayo de metilación de ADN mediante Ms-SNuPE

Se utilizó un microgramo de ADN genómico para la modificación con bisulfito en placas de 96 pocillos (96 deep-well Methylation-Gold kit, Zymo Research, EEUU) tal y como se especifica en las recomendaciones del fabricante. Los cebadores y sondas para el ensayo Ms-SNuPE se diseñaron mediante MethPrimer [385] (Tabla 6) y se testaron posibles estructuras secundarias y dímeros mediante los softwares Oligos v.9.11.4 y Mfold web server [386], para su combinación en ensayo multiplex. Las reacciones se llevaron a cabo como se ha descrito previamente [387]. Brevemente, se ha usado el protocolo habitual de la técnica de SNaPshot con modificaciones para hacerla cuantitativa y apta para secuencias de ADN modificadas con bisulfito. El diseño de cebadores y sondas es complicado especialmente para sitios CpG en islas. Aunque es posible usar sondas con sitios degenerados, se ha evitado pues pueden dar lugar a la aparición de varios picos para una misma posición, complicando el análisis de los electroferogramas. Para evitarlo, se utilizaron iosinas para las posiciones variables, obteniendo siempre productos de SNaPshot de la misma longitud. Estas iosinas deben estar alejadas del extremo 3'OH para evitar uniones inespecíficas. El primer paso consistió en una reacción de PCR multiplex con KAPA2G fast HotStart (Kapa Biosystems, Woburn MA) en un volumen final de 10 $\mu$ l, usando 3mM MgCl<sub>2</sub> y 0,2 $\mu$ M de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C de desnaturalización inicial durante 15 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C, 15 segundos; hibridación a 60°C, 90 segundos; y extensión a 72°C, 90 segundos. La extensión final se realizó a 72°C durante 10 minutos. A continuación se eliminan los cebadores mediante digestión con Exonucleasa I (Epicentre, Madison, WI) y fosfatasa alcalina (FAstAP Thermosensitive Alkaline Phosphatasa (Thermo Scientifica, Madrid, España)) durante 30 minutos a 37°C y 15 minutos a 75°C. Posteriormente se realiza la reacción de SNaPshot (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Por último se procede a la eliminación de los ddNTPs

no incorporados mediante tratamiento con fosfatasa alcalina, durante 1 hora a 37°C y 15 minutos a 75°C. Una vez obtenidas las alturas de los picos correspondientes a cada sitio CpG del electroferograma se calcula el porcentaje de metilación con la fórmula:

$$\%C^{met} = 100x \frac{(Altura\ de\ pico\ C)}{(Altura\ de\ pico\ C + Altura\ de\ pico\ T)}$$

Las concentraciones óptimas de cebadores y sondas se determinaron previamente para evitar la saturación o ineficiencia de la reacción. Además se llevaron a cabo reacciones con ADN no modificado con bisulfito para testar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados. Todas las muestras se ensayaron en duplicado y aquellas con coeficientes de variación mayores al 10% fueron repetidas. Se añadió una muestra control a todas las placas del estudio para evaluar la reproducibilidad interensayo.





## Medición de la longitud de los telómeros

Para la determinación de la longitud de los telómeros se utilizó el método de qPCR previamente descrito por Cawthon [300]. Este método se basa en la amplificación de la repetición de la secuencia telomérica referenciada a la amplificación de un gen de copia única, proporcionando una medida relativa en pacientes respecto a controles. Para ambos amplicones, telómero y gen de copia única, en este caso el gen 36B4, se llevaron a cabo las reacciones en un volumen de 15µL utilizando el robot pipeteador automático CAS-1200 (Corbett, Mortlake, Australia) para asegurar la máxima precisión de pipeteo. Las secuencias de los cebadores fueron:

tel1: GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT;

tel2: TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA,

36B4u: CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC

36B4d: CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

La PCR del amplicón del telómero contiene: 35ng de ADN genómico, 7.5µL de SYBR Green Fast qPCR Master Mix 2X (Biotool, Munich, Alemania), 0.27pmol de cebador derecho (Tel1), 0.9pmol del cebador reverso (Tel2) y agua destilada hasta completar los 15µL. Las condiciones de amplificación fueron: incubación inicial de 95°C durante 15 minutos, seguida de 20 ciclos de 95°C, 15s y 54°C durante 2 minutos. La PCR del amplicón del gen de copia única contiene los mismos reactivos a excepción de los primers, que consistieron en 0.3pmol del cebador derecho (36B4u) y 0.5pmol del reverso (36B4d). Las condiciones de amplificación fueron: una incubación inicial de 95°C durante 15 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C, 15s y 58°C durante 1 minuto. Se utilizó para llevar a cabo la amplificación el termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett, Mortlake, Australia). La curva standard se realizó con diluciones desde 1.25ng a 100ng de ADN por reacción. En cada rotor se incluyeron tres calibradores para normalización de los resultados.

| Parámetro  | B     | Err Std | t-valor | p-valor                 |
|------------|-------|---------|---------|-------------------------|
| Intercepto | 84.7  | 4.3     | 19.5    | $< 1.0 \times 10^{-16}$ |
| cg16386080 | 59.5  | 4.9     | 12.3    | $2.4 \times 10^{-29}$   |
| cg24768561 | 33.9  | 5.9     | 5.8     | $1.5 \times 10^{-08}$   |
| cg19761273 | -44.0 | 9.8     | 4.48    | $1.0 \times 10^{-05}$   |
| cg25809905 | -19.7 | 5.4     | 3.7     | $2.9 \times 10^{-04}$   |
| cg09809672 | -22.8 | 6.5     | 3.5     | $5.0 \times 10^{-04}$   |
| cg02228185 | -16.8 | 4.8     | 3.5     | $5.5 \times 10^{-04}$   |
| cg17471102 | -17.7 | 6.5     | 2.7     | 0.006                   |
| cg10917602 | -11.4 | 5.1     | 2.2     | 0.026                   |

**Tabla 7. Parámetros de la regresión lineal múltiple de la DmAM de 8 CpGs. El modelo se calibró utilizando la cohorte de entrenamiento. Err Std = Error estándar.**

### 3. Análisis de los resultados

#### Estimación de la edad biológica basada en 8 sitios CpG

Se utilizaron 390 donantes sanos de ascendencia caucásica de entre 20 y 80 años [369], que conforman la designada como cohorte de entrenamiento (Tabla 2), para definir los parámetros del modelo de 8 sitios CpG. Los datos disponibles para esta cohorte constan de los valores  $\beta$  de metilación para 102 sitios CpG fuertemente correlacionados con la edad cronológica de los donantes (correlación de Pearson  $r > 0.85$  o  $r < -0.85$ ) de los cuales seleccionamos aquellos más informativos mediante regresión por pasos hacia delante. En cada paso de la regresión se comprobó que el sitio CpG candidato era apto para el ensayo mediante *methylation-sensitive single-nucleotide primer extension* (MS-SNuPE) [388]. Si el sitio podía incluirse en el ensayo multiplex se incorporaba al modelo de regresión; en caso contrario, se descartaba y se procedía nuevamente a la regresión por pasos sin este sitio CpG. Los sitios CpG se incorporaron en el modelo con un umbral de p de 0.05. Los coeficientes B, obtenidos por regresión múltiple en la cohorte de entrenamiento, de los 8 sitios CpG constituyeron la medida de edad biológica utilizada para sangre completa en este

estudio (Tabla 7). La DmAM se evaluó en las cohortes de validación (Tabla 3). Se utilizó la cohorte de validación 1 debido a la disponibilidad de datos del chip de metilación Human Methylation 450K Bead-Chip para la comparación de la DmAM de 8 sitios CpG con otras DmAM previamente publicadas (Horvath, Hannun, Weidner). Esta cohorte consta de 335 controles sanos no utilizados previamente en la calibración de ninguno de las DmAM sometidas a comparación. La precisión de las predicciones de edad se evaluó mediante correlación y desviación absoluta media (por sus siglas en inglés *mean absolute deviation*, MAD) entre edad predicha y observada.

### **Análisis del reloj biológico basado en la metilación del ADN**

Estimamos la edad biológica de muestras de sangre, tanto de los pacientes con artrosis como de los pacientes con artritis reumatoide y sus respectivos controles, utilizando los niveles de metilación de 8 sitios CpG que conforman la DmAM definida anteriormente. Por otra parte se utilizó la DmAM de Horvath, basado en 353 sitios CpG, para la predicción de la edad biológica de las muestras de hueso y cartílago, por su demostrada validez en múltiples tejidos [94]. Las comparaciones entre grupos (pacientes y controles) se llevaron a cabo con análisis de covarianza (ANCOVA) incluyendo la edad cronológica y el sexo como covariables. Las diferencias medias en las estimaciones de la edad biológica se calcularon tras ajustar por sexo y edad mediante el análisis de residuales de regresión lineal múltiple. Para todos estos análisis se utilizó el software Statistica 7.0 (Stat Soft, Inc.). El análisis *post-hoc* de poder estadístico se realizó con G\*Power 3 utilizando  $\alpha = 0.05$  [389].

En la cohorte de validación de pacientes de AR, se utilizó también la DmAM de Horvath [94] y de Hannun [88] para estimar la edad biológica de pacientes y controles. Posteriormente se realizó el análisis caso-control mediante ANCOVA de las estimaciones de edad biológica obtenidas con los distintas DmAM, corrigiendo por sexo y edad. Se utilizó también la corrección descrita por Houseman de subpoblaciones sanguíneas. Esta corrección se basa en la estimación de las cantidades

relativas de cada subpoblación sanguínea para cada individuo según los datos de metilación del array de Illumina, tal y como se describe previamente [390].

### Estimación del acortamiento telomérico

Se llevó a cabo una normalización de los resultados entre rotores basada en los tres calibradores de 160, 35 y 2 ng incluidos en cada rotor. Para ello, se utilizó una regresión lineal para estimar la pendiente y el punto de intercepción (PI) de la recta que conformaban estos tres puntos en cada rotor utilizando la ecuación  $Y = \text{pendiente} * X + \text{PI}$ , donde Y es el valor Ct y X el  $\log_{10}$  de la cantidad de ADNg. Posteriormente, se ajusta la recta de cada rotor individual a la recta media de todos los rotores a fin de estandarizar y corregir las desviaciones entre rotores.

Las eficiencias de cada reacción se calcularon utilizando la ecuación  $E = 10^{(1/\text{pendiente})}$ , donde el 100% de eficiencia sería  $E=2$  a partir de la curva de calibración con diluciones seriadas. Se obtuvo un valor de 1.8 para la amplificación de los telómeros y de 2.0 para el gen 36B4. Cada una de las curvas de calibración mostró un coeficiente de correlación lineal superior a 0.99.

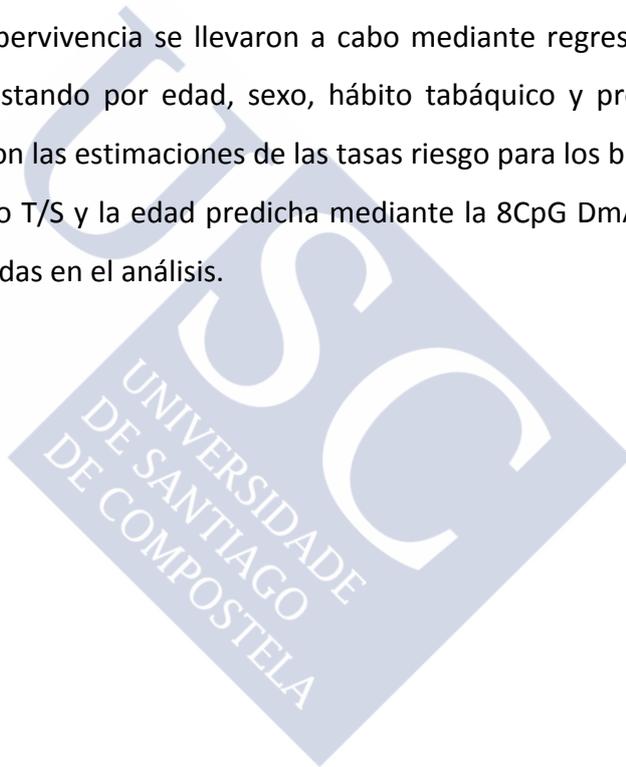
Finalmente, los valores Ct se obtuvieron automáticamente mediante el análisis de cuantificación comparativa en el Rotor-Gene 6000, que estima un punto para cada pocillo utilizando el método del máximo de la segunda derivada en base a un modelo de curva de amplificación sigmoideal. El cálculo de la ratio T/S se obtuvo de la ecuación  $E_{\text{TEL}}^{\text{Ct}_{\text{TEL}}} / E_{36\text{B4}}^{\text{Ct}_{36\text{B4}}}$ . Se aplicó el Ln a todos los ratios T/S para transformar los datos a una distribución normal.

Una vez obtenidos los valores de  $\text{Ln}(T/S)$ , se realizó el análisis caso-control mediante ANCOVA corrigiendo por sexo y edad. Los valores de los controles y los pacientes se correlacionaron en conjunto con la edad cronológica mediante correlación de Spearman utilizando para ambos análisis el software Statistica 7.0 (Stat Soft, Inc.).

## **Análisis de la mortalidad en la AR**

Los controles y pacientes con artritis reumatoide incluidos en este análisis se reclutaron desde el 2001 hasta el 2009 y la valoración del estado final se realizó en Noviembre de 2015. Se consideraron como puntos finales la fecha del fallecimiento (datos completos) o la fecha de la última visita o análisis médico recopilada en la base de datos del JANUS (datos censurados). Debido a la falta de datos y aparentes sesgos en los disponibles no se analizaron las causas específicas de fallecimiento.

Los análisis de supervivencia se llevaron a cabo mediante regresión de riesgo proporcional de Cox, ajustando por edad, sexo, hábito tabáquico y presencia de la enfermedad. Se obtuvieron las estimaciones de las tasas riesgo para los biomarcadores de edad biológica, el ratio T/S y la edad predicha mediante la 8CpG DmAM, así como para las covariables incluidas en el análisis.



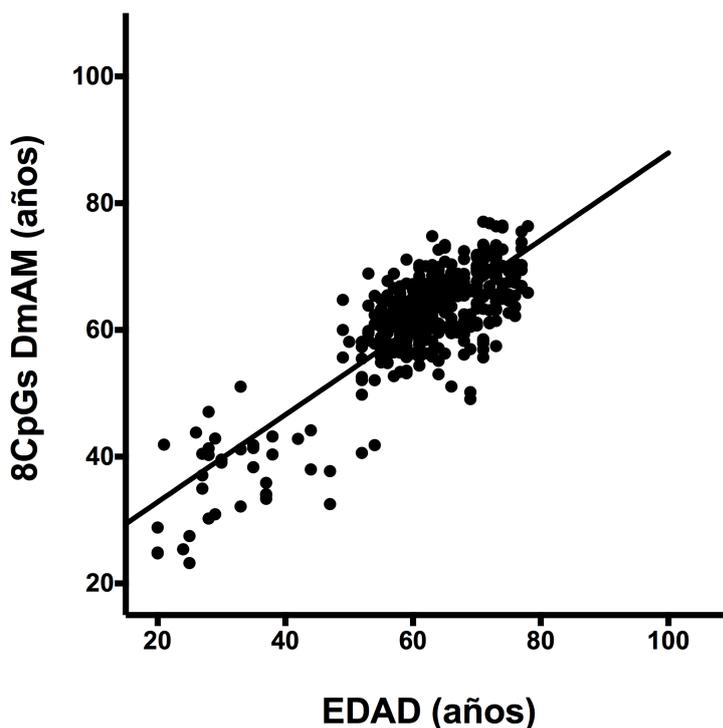
# RESULTADOS

## 1. Predicción de edad biológica mediante 8 sitios CpG

Las medidas de edad biológica basados en metilación del ADN, DmAM, previamente definidos en la literatura no eran aptos para la aplicación en nuestro estudio, bien por requerir la realización de un chip de metilación de Illumina, dado el elevado número de sitio CpG que incluyen, o bien por utilizar rangos de edad y metodologías no adaptadas a nuestro estudio y laboratorio [88], [391]. Por lo tanto, definimos una nueva medida de edad biológica. Esta DmAM se ha desarrollado a partir de los datos de 390 sujetos sanos mayores de 20 años a los que nos referiremos como cohorte de entrenamiento (Tabla 3).

Para ello, seleccionamos mediante regresión lineal por pasos hacia delante de entre los 120 sitios CpG más correlacionados con la edad disponibles en Weidner et al [369], aquellos más asociados con la edad que además pueden ser determinados con un ensayo MS-SNuPE. Todos los sitios CpG seleccionados mostraron una contribución significativa al modelo de regresión múltiple (Tabla 7). Solo dos de los sitios CpG seleccionados mostraron un incremento de metilación con la edad, mientras que los otros 6 disminuyen con la misma. El nuevo modelo de 8CpGs dio lugar a una estimación precisa de la edad en la cohorte de entrenamiento de 390 muestras de sangre ( $R^2 = 0.68$ ,  $P < 10^{-16}$ ; y MAD=5.07 años; Figura 8).

La precisión de la estimación fue similar en los diferentes rangos de edad a partir de los 30 años (Tabla 8), mostrando la mayor MAD en los extremos de la distribución y siendo la estimación más precisa cerca de la media, efecto común en las DmAM modelizadas mediante regresión.



**Figura 8. Estimación de la edad mediante la DmAM de 8 CpGs en las muestras de sangre.** En los gráficos de dispersión se representa la edad en el eje de las abscisas y la estimación mediante la DmAM de 8 CpGs en el eje de ordenadas de los 390 controles sanos de la cohorte de entrenamiento. La línea representa la regresión de mínimos cuadrados de los datos.

| Intervalo de edad | Edad media | N   | MAD | Diferencia media |
|-------------------|------------|-----|-----|------------------|
| 20 a 29           | 25.4       | 17  | 9.2 | 9.0              |
| 30 a 49           | 39.5       | 23  | 6.6 | 3.1              |
| 50 a 59           | 56.3       | 93  | 4.9 | 3.6              |
| 60 a 69           | 64.0       | 158 | 4.1 | -0.3             |
| 70 a 78           | 72.8       | 99  | 5.7 | -5.2             |
| Total             | 61.2       | 390 | 5.1 | 0.00             |

**Tabla 8. Precisión de la DmAM de 8 CpGs en los diferentes intervalos de edad de la cohorte de entrenamiento.** N= tamaño muestral, MAD = Desviación absoluta de la media.

Para comparar la precisión del modelo con otros modelos previamente publicados [88], [94], [369] utilizamos la cohorte de validación 1 (Tabla 3), no utilizada previamente para la estimación de ninguno de los modelos a comparar [370]. El mejor modelo fue el de Horvath [94], seguido del de Hannum [88], ambos con el mayor número de CpGs y la función matemática más sofisticada para la predicción. Ambos mostraron las menores MAD y la mayor correlación con la edad. Es importante tener en cuenta que en el modelo de Hannum se han incluido solamente los datos de metilación y no las variables clínicas (Tabla 9).

| <b>DmAM</b>                  | <b>Nº CpGs</b> | <b>MAD</b> | <b>R<sup>2</sup> Ajustada</b> | <b>Rho Spearman</b> | <b>Diferencia media</b> |
|------------------------------|----------------|------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------|
| <b>Horvath</b>               | 353            | 4.4        | 0.77                          | 0.87                | -1.0                    |
| <b>Hannum <i>et al.</i></b>  | 71             | 7.1        | 0.84                          | 0.90                | -6.7                    |
| <b>8 CpGs</b>                | 8              | 7.3        | 0.60                          | 0.75                | -4.8                    |
| <b>Weidner <i>et al.</i></b> | 3              | 8.5        | 0.33                          | 0.57                | 3.8                     |

**Tabla 9. Comparativa entre la DmAM de 8 CpGs y otras DmAMs en la cohorte de validación 1.** MAD = Desviación absoluta de la media.

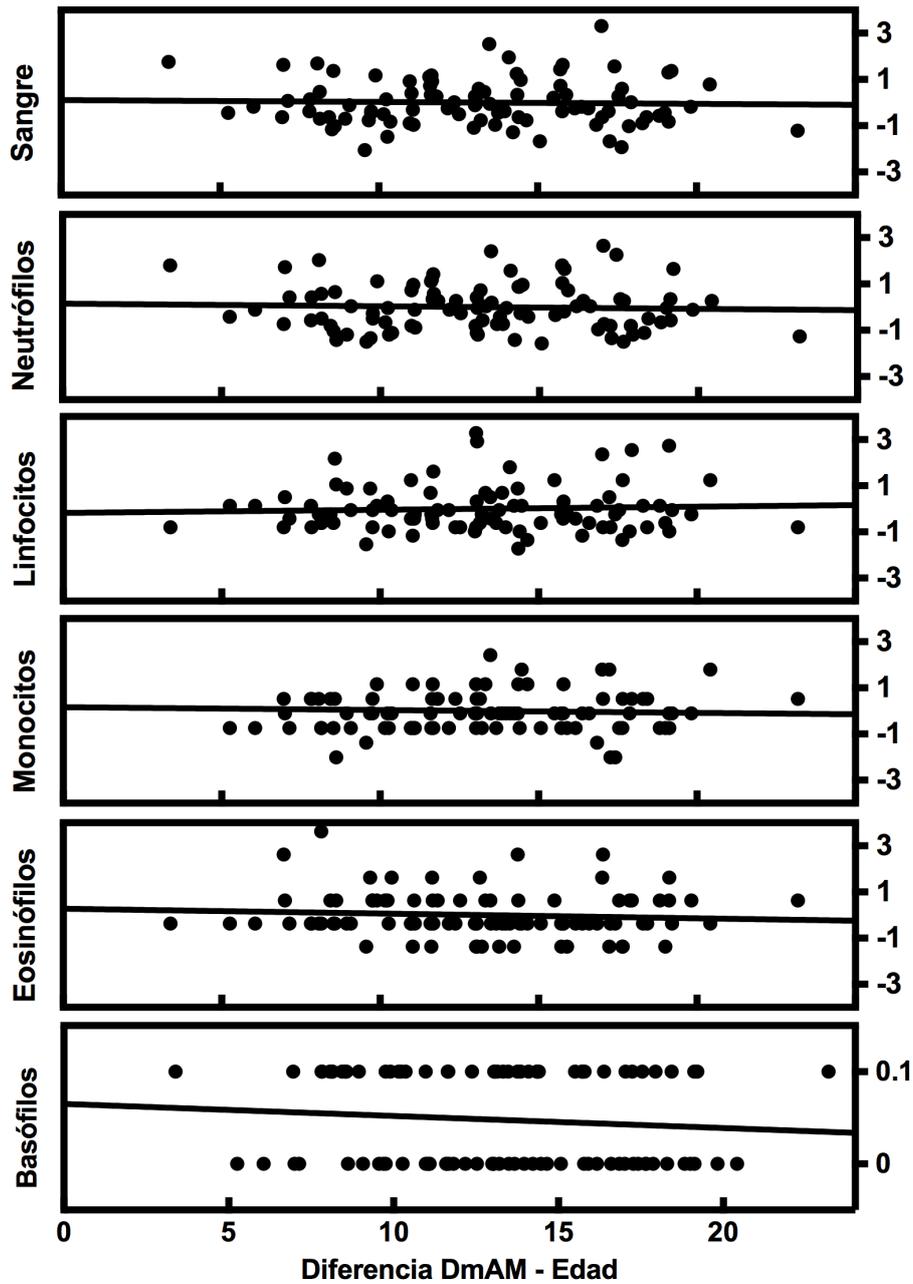
Nuestro modelo de 8CpGs predice la edad con una precisión intermedia entre los modelos con mayor número de CpGs y el modelo basado en solo 3 CpGs. En cuanto a los coeficientes de correlación, este modelo se encuentra más cercano a los modelos de Hannum y Horvath que al modelo de Weidner. Además, muestra una menor diferencia entre la media de edad observada y la media de edad estimada que el modelo de Hannum.

Por lo tanto, el modelo desarrollado de 8CpGs es menos preciso que los basados en decenas o cientos de sitios CpGs, que requieren el uso de microarrays de metilación, pero más preciso que el modelo de solo tres CpGs, indicando que alcanza un compromiso entre la precisión de la estimación y la viabilidad del ensayo para su aplicación a muchas muestras.

|                    | <b>Beta</b> | <b>Err. Std.</b> | <b>p-valor</b>         |
|--------------------|-------------|------------------|------------------------|
| <b>Edad</b>        | 0.77        | 0.07             | $3.63 \times 10^{-18}$ |
| <b>Neutrófilos</b> | 0.01        | 0.07             | 0.9                    |
| <b>Linfocitos</b>  | -0.02       | 0.07             | 0.7                    |
| <b>Monocitos</b>   | 0.004       | 0.08             | 0.9                    |
| <b>Basófilos</b>   | 0.03        | 0.08             | 0.7                    |
| <b>Eosinófilos</b> | 0.03        | 0.07             | 0.7                    |

**Tabla 10. Análisis de regresión múltiple entre la estimación de 8 CpGs y los recuentos celulares por cada  $10^9$  litros de sangre.** Err. Std. = Error estándar.

La complejidad de la sangre y la variabilidad de los niveles de metilación en los distintos tipos celulares que la componen pueden ser factores de confusión que afectan a los DmAM. Por ello, determinamos la influencia de las distintas subpoblaciones sanguíneas en la nueva DmAM de 8 CpGs. Para ello se utilizó la cohorte de validación de Lam et al, [374]. Este análisis mostró que la variación en las subpoblaciones celulares mayoritarias no alteraba significativamente los resultados (Figura 9). De hecho, todos los coeficientes  $\beta$  correspondientes a las subpoblaciones fueron inferiores a 0.03 con p-valores mayores de 0.7 (Tabla 10) a pesar de que la asociación con la edad tuvo un coeficiente  $\beta$  de 0.77 y un p-valor menor de  $10^{-18}$ .

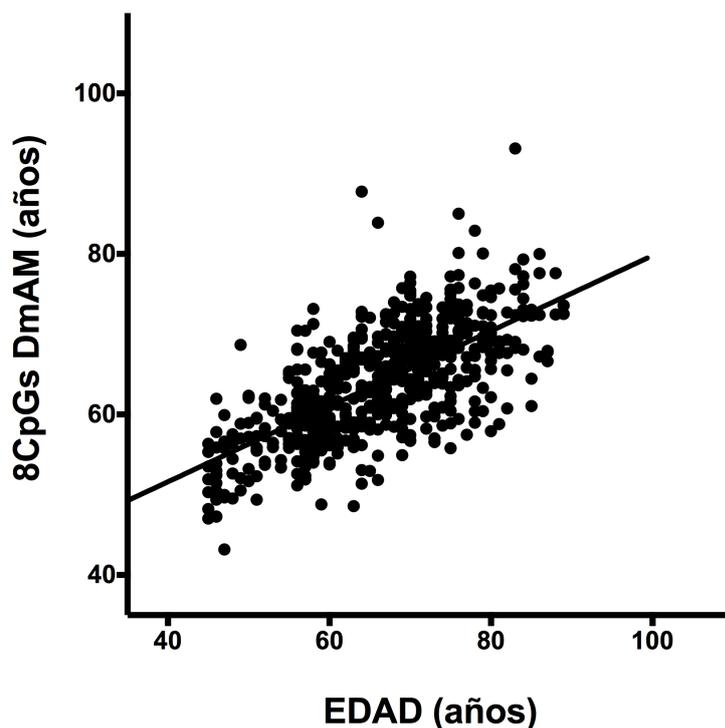


**Figura 9.** Ausencia de variación de la estimación mediante la DmAM de 8 CpGs en relación a la composición sanguínea de la cohorte de validación 2. Cada rectángulo representa la regresión lineal de la diferencia entre la estimación mediante 8CpGs y la edad frente al recuento del número de células de sangre total, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos, respectivamente. Estos recuentos se consideraron como puntuaciones Z tras transformación en una distribución normal estandarizada,

excepto el recuento de basófilos que no se ha transformado puesto que presentaba una distribución dicotómica.

Otros posibles factores de confusión como el sexo y el hábito tabáquico se analizaron en la cohorte de validación 1 que es la de mayor tamaño muestral disponible. La DmAM de 8 CpGs no se encontró asociado ni con el hábito tabáquico ( $\beta=-0.02$ , p-valor= 0.6) ni con el sexo ( $\beta=-0.005$ , p-valor=0.9).

Los resultados obtenidos hasta aquí, tanto con la cohorte de entrenamiento como con las cohortes de validación, indican que la DmAM de 8 CpG es válida. Sin embargo, es necesario comprobar su validez en datos obtenidos mediante MS-SNuPE ya que los anteriores provienen de chips de metilación. Para ello usamos 557 controles, de los que se obtuvo el nivel de metilación de los 8CpGs mediante MS-SNuPE en el 97.6% de las muestras, fallando alguno de los CpGs en el 2.4 % restante. El método mostró un coeficiente de variación entre placas del 3.3%. La DmAM estimada a partir de estos datos mostró una precisión similar a la encontrada en las cohortes anteriores (Figura 10) con una correlación y una desviación media absoluta aceptables ( $R^2 = 0.45$ ,  $P < 10^{-16}$ ; MAD = 6.70 años). La diferencia media entre la edad estimada y la cronológica fue de -2.1 años, mejor que la observada para la primera cohorte de validación (Tabla 9). Sin embargo, la correlación lineal fue menor que la encontrada en la cohorte de entrenamiento ( $R^2$  ajustada = 0.45,  $p < 10^{-16}$ ; R Spearman = 0.67), aunque en la figura 10 puede observarse la agrupación de los datos entorno a la línea de regresión, con solo unos pocos puntos con diferencias notables entre la edad estimada y la cronológica. Esta ausencia de dispersión se muestra también por una desviación estándar de los residuales menor que la observada con la primera validación (7.4 años frente a 8.2 años). Estos datos indican que la disminución observada en el coeficiente de correlación se debe al menor rango de edad estudiado en esta cohorte de validación (de 35 años, en contraposición a los 50 de la primera cohorte).



**Figura 10.** Estimación de la edad mediante la DmAM de 8 CpGs basado en MS-SNuPE en sangre de 557 controles. En los gráficos de dispersión se representa la edad en el eje de las abscisas y la estimación mediante la DmAM de 8 CpGs en el eje de ordenadas. La línea representa la regresión de mínimos cuadrados de los datos.

## 2. Estudio de envejecimiento celular en pacientes con artrosis

### Reloj biológico de metilación en pacientes con artrosis

Existen dos estudios realizados con el chip de metilación de Illumina en pacientes con artrosis y controles, utilizando muestras de hueso y cartílago [377], [378]. Las características de estas muestras se detallan en la Tabla 4. Gracias a la disponibilidad de los datos pudimos aplicar el reloj biológico de Horvath [94], actualmente el único validado para muestras de diferentes tejidos.

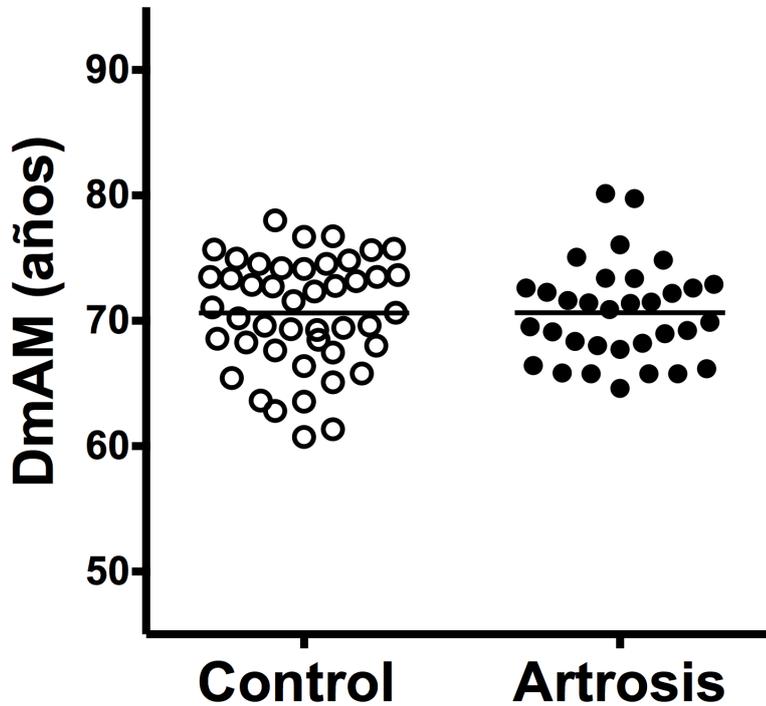
La edad biológica estimada en cartílago mostró diferencias con la edad cronológica (Figura 11). Los pacientes con artrosis presentan un envejecimiento de 3.7 años respecto a los controles (Tabla 11). Esta diferencia corresponde al conjunto de las muestras de cartílago, que incluyen tanto las de la meseta tibial como las de la cabeza femoral. También se encontró un envejecimiento prematuro en el subgrupo de muestras de la meseta tibial, con una diferencia de 5.3 años (IC 95% = 2.4 a 8.2 años). Sin embargo no pudo realizarse un subanálisis solo de los cartílagos de cabeza femoral debido al pequeño número de muestras. Estas comparaciones se ajustaron por sexo y edad en todos los casos.

| Tejido    | Condición        | $\Delta$ DmAM (IC 95%) | P-valor |
|-----------|------------------|------------------------|---------|
| Cartílago | Rodilla / Cadera | 3.7 (1.1 a 6.3)        | 0.008   |
| Hueso     | Cadera           | 0.04 (-1.8 a 1.9)      | 0.3     |
| Sangre    | Mano             | 0.01 (-1.1 a 1.1)      | 0.98    |
|           | Rodilla          | 0.04 (-0.9 a 1.0)      | 0.9     |
|           | Cadera           | -0.7 (-1.7 a 0.3)      | 0.11    |

**Figura 11. Envejecimiento prematuro en muestras de cartílago.** DmAM en muestras de cartílago de pacientes con artrosis (N=31) en comparación con cartílago de individuos control (N=36). La diferencia corresponde a 3.7 años ( $p=0.008$ ). La edad epigenética está representada ajustada por sexo y edad y las líneas horizontales corresponden a la media de cada grupo.

Sin embargo, las edades biológicas y cronológicas de las muestras de hueso fueron similares en los pacientes con artrosis en la cadera y los controles (Figura 12, Tabla 11). Tampoco se hallaron diferencias en el subanálisis que incluye solo controles de fractura (OP) ( $\Delta$ DmAM = 0.52, IC 95 % = -1.50 a 2.54,  $P = 0.6$ ), lo que refuerza este resultado negativo. Los controles provenientes de cadáveres sanos son un número

insuficiente para realizar un análisis por separado, pero mostraron la misma tendencia que los controles fracturados.

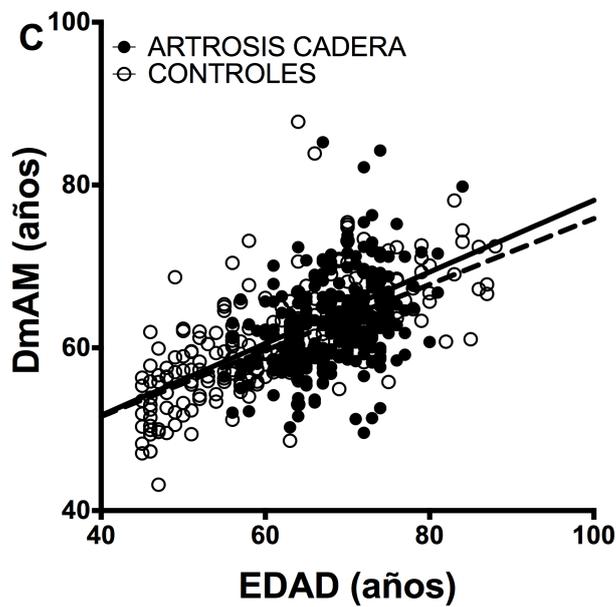
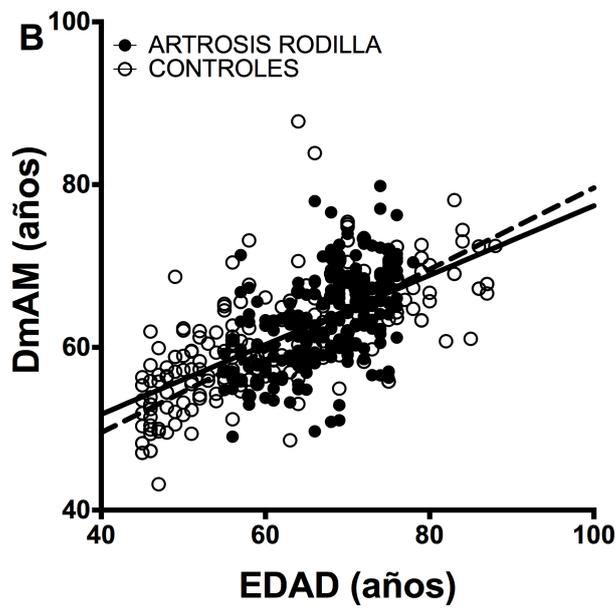
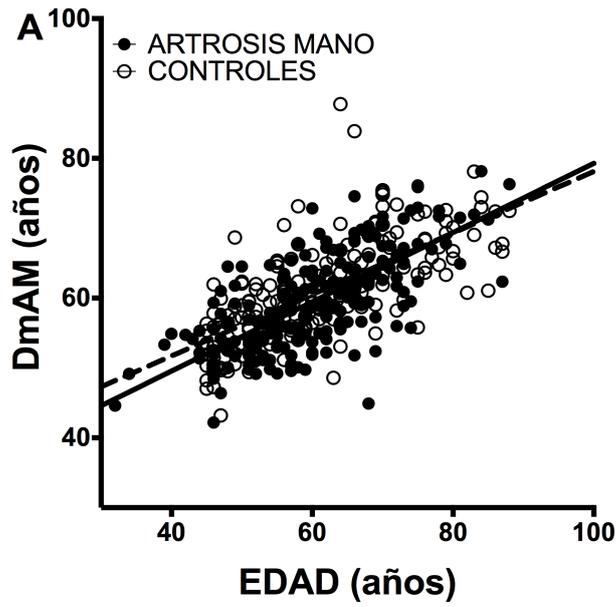


**Figura 12. Ausencia de diferencias en la edad epigenética entre muestras de hueso.** DmAM en muestras de hueso de pacientes con artrosis (N=33) y muestras de hueso de controles (N=45), ( $\Delta$ DmAM = 0.04 años,  $p=0.3$ ). La edad epigenética está representada ajustada por sexo y edad y las líneas horizontales corresponden a la media de cada grupo.

Se ensayaron los 8 sitios CpGs que componen la medida de edad biológica en sangre en 890 muestras de sangre de pacientes con artrosis en la mano, la rodilla o la cadera, así como en controles sin síntomas ni signos de artrosis (Tabla 4). El ensayo MS-SNuPE mostró una tasa de resultados aceptables para los 8 sitios CpG del 93.0 %, con una elevada reproducibilidad entre placas (CV = 3.2%). La edad en los 182 controles libres de artrosis utilizados pudo estimarse con precisión mediante la DmAM de 8 CpG obteniéndose una diferencia entre la edad cronológica y la estimada mediante la DmAM de -0.1 años (DS = 8.7 años).

La comparación de las edades biológicas obtenidas mediante la DmAM de 8CpGs en sangre completa no mostró diferencias significativas entre pacientes y controles. No se observó un envejecimiento prematuro en los pacientes, que tuvieron DmAM similares a los controles sanos, tanto en el caso de los pacientes con artrosis en la mano (Figura 13A), como en los de artrosis de rodilla (Figura 13B), o en los de cadera (Figura 13C). Esta similitud se observa claramente en las diferencias, próximas a cero, entre edad cronológica y edad biológica estimada (Tabla 11). La diferencia de mayor magnitud se observó en los pacientes con artrosis de cadera, pero además de no alcanzar valores significativos muestra una dirección opuesta al envejecimiento prematuro. Todas las comparaciones se ajustaron por sexo y edad.

**Figura 13. Ausencia de envejecimiento prematuro en la sangre de pacientes con artrosis.** Los gráficos de dispersión representan la edad en el eje de abscisas frente a la edad epigenética estimada mediante la DmAM de 8 CpGs en el eje de ordenadas. Los círculos vacíos corresponden a los controles libres de artrosis (N= 182) junto con A) pacientes con artrosis en la mano (N=206), B) pacientes con artrosis en la rodilla (N= 229) y C) pacientes con artrosis en la cadera (N=273), todos representados mediante puntos negros. Las líneas representan la regresión de mínimos cuadrados de los datos.

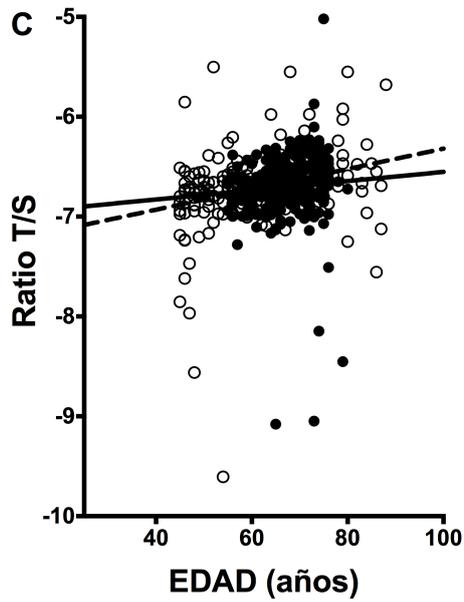
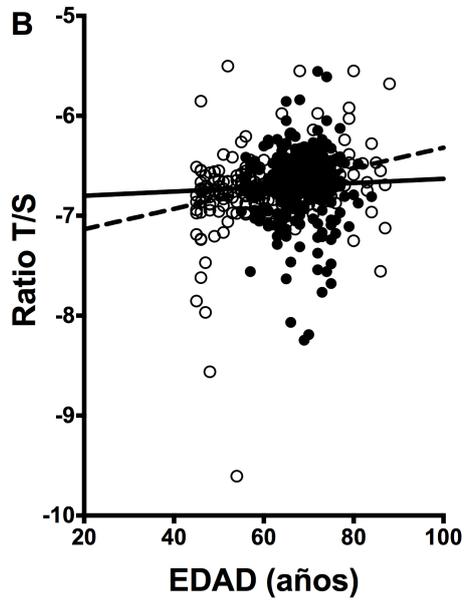
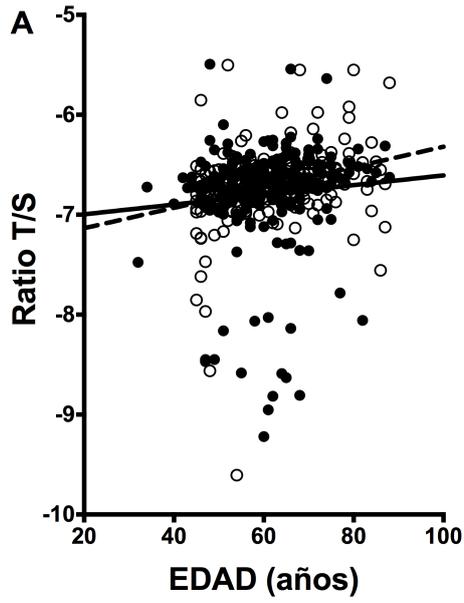


## Acortamiento telomérico en pacientes con artrosis

Se analizó la longitud de los telómeros en las 890 muestras de sangre que se han descrito previamente (Tabla 3), mediante qPCR. Los resultados cumplieron los requisitos de control de calidad. Así, los coeficientes de variación entre ensayos de los calibradores de 160, 35 y 2 ng fueron 4.8, 4.3 y 2.8 %, respectivamente. Además, estos CV se redujeron todavía más tras la normalización entre rotores hasta el 1.0, 1.7 y 0.8 %, respectivamente. Por otra parte, el CV medio de los duplicados de las muestras fue de 0.79 % para el amplicón del telómero (rango = 0.00 a 4.69) y de 0.28 % para el amplicón del gen 36B4 usado como referencia (rango = 0.00 a 3.71).

La ratio T/S que mide la longitud relativa de los telómeros se correlacionó con la edad cronológica en el análisis conjunto de casos y controles con un coeficiente de correlación de Spearman de 0.18 ( $p = 3.0 \times 10^{-8}$ ). No se encontraron diferencias significativas en la longitud de los telómeros entre casos y controles. Esto fue así, para los pacientes con artrosis de mano ( $\Delta T/S \text{ ratio}_{(\text{pacientes-controles})} = 0.04$ ; p-valor = 0.42) (Figura 14A), o con artrosis de rodilla ( $\Delta T/S \text{ ratio} = 0.004$ , p-valor = 0.92) (Figura 14B), o de cadera ( $\Delta T/S \text{ ratio} = 0.03$ ; p-valor = 0.42) (Figura 14C). Tampoco se hallaron diferencias significativas en el análisis conjunto de todos los pacientes con artrosis comparados con los controles ( $\Delta T/S \text{ ratio} = 0.03$ ; p-valor = 0.48). Todos los datos fueron analizados mediante ANCOVA incluyendo las covariables sexo y edad.

En todos los grupos los varones presentaron una longitud de los telómeros menor que las mujeres, si bien solo se alcanzan diferencias significativas en el análisis conjunto ( $\Delta T/S \text{ ratio}_{(\text{varones-mujeres})} = 0.07$ ; p-valor = 0.02).



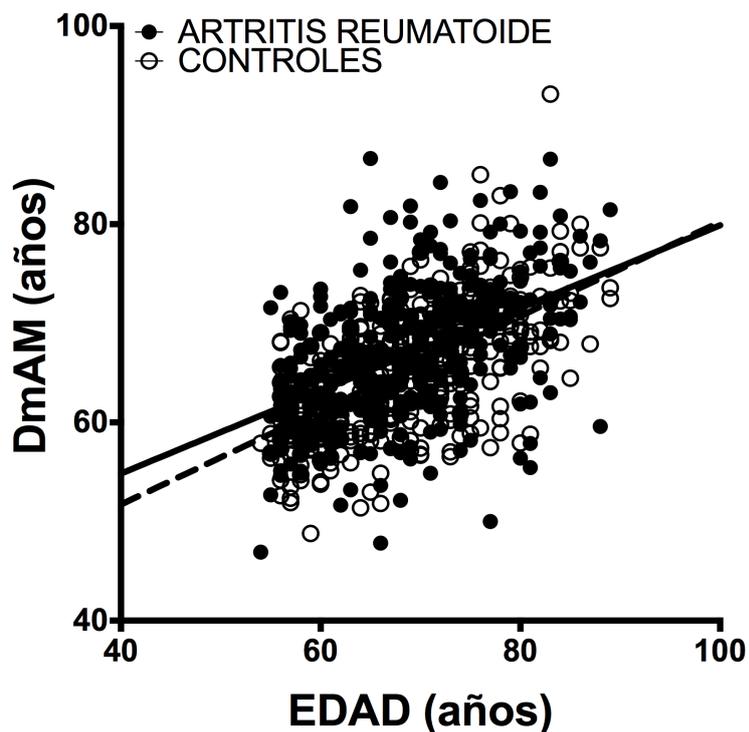
**Figura 14. Ausencia de acortamiento telomérico en la sangre de pacientes con artrosis.** Los gráficos de dispersión representan la edad en el eje de abscisas frente a la medida relativa de la longitud de los telómeros en el eje de ordenadas. Los círculos vacíos corresponden a los controles libres de artrosis (N= 182) junto con A) pacientes con artrosis en la mano (N=206), B) pacientes con artrosis en la rodilla (N= 229) y C) pacientes con artrosis en la cadera (N=273), todos representados mediante puntos negros. Las líneas (punteadas en el caso de controles y continuas para los pacientes) representan la regresión de mínimos cuadrados de los datos.

### 3. Estudio de envejecimiento celular en pacientes con artritis reumatoide

#### Reloj biológico de metilación en pacientes con artritis reumatoide

Se analizaron 735 muestras de ADN de sangre completa mediante MS-SNuPE para los 8 CpGs que componen la DmAM de edad previamente descrita. La tasa de resultados válidos para los 8 sitios fue de 97.6 %. Los demás datos de control de calidad incluyeron el CV entre placas descrito en el análisis de las muestras de artrosis y el CV entre los duplicados de las muestras específicas de este análisis que fue menor al 3.1% tanto en casos como en controles, con una media de 2.9%.

La edad biológica obtenida con el DmAM de 8 CpG mostró una  $R^2=0.35$  ( $p<0.0001$ ) con la edad cronológica y una MAD de 5.79 años en los controles. Estos resultados contribuyen a mostrar la validez de esta DmAM. Las diferencias de DmAM entre casos y controles tras ajustar por sexo y edad mostraron un envejecimiento significativo en los pacientes con AR (DmAM pacientes = 67.20, DS = 5.83, vs. controles = 65.30, DS = 5.51;  $p$ -valor = 0.000005). Sin embargo, la magnitud de la diferencia fue pequeña ( $\Delta$ DmAM = 1.90 años; IC 95% = 1.08 a 2.72) (Figura 15).



**Figura 15. Comparación de las DmAM de 8 CpG en la sangre de pacientes con AR y de controles.** DmAM en pacientes con AR (puntos oscuros) y controles (círculos huecos) en relación con la edad cronológica. Las líneas se corresponden con la regresión de mínimos cuadrados de cada grupo. Hay diferencias significativas en el punto de intersección con la Y, pero no en las pendientes.

En base a esta diferencia entre casos y controles, se analizó la DmAM en relación a las características clínicas en los pacientes con artritis reumatoide. Ninguna característica, ni la presencia de erosiones, del epítipo compartido, de los anticuerpos anti-CCP, del FR, ni la edad de inicio de la enfermedad o la duración de la misma mostraron asociación con la DmAM. Tampoco el hábito tabáquico mostró asociación con el envejecimiento prematuro, si bien en esta cohorte de pacientes existe un porcentaje bajo de fumadores (Tabla 12). Solo se encontraron diferencias en relación al sexo, ya que las mujeres presentan menor DmAM que los hombres ( $\Delta$ DmAM = -2.12 años; IC 95% = -2.96 a -1.28; p-valor = 0.00001).

|                   | DmAM       |            |                         |
|-------------------|------------|------------|-------------------------|
|                   | Beta valor | Error Std. | p-valor                 |
| <b>Intercepto</b> | 38,40      | 3,00       | $< 1,0 \times 10^{-16}$ |
| <b>Edad</b>       | 0,42       | 0,04       | $< 1,0 \times 10^{-16}$ |
| <b>Sexo</b>       | -1,01      | 0,47       | 0,03                    |
| <b>Tabaquismo</b> | -0,27      | 0,54       | 0,62                    |
| <b>Erosiones</b>  | 0,23       | 0,40       | 0,57                    |
| <b>FR</b>         | 0,27       | 0,43       | 0,52                    |
| <b>Anti-CCP</b>   | -0,64      | 0,42       | 0,13                    |

**Tabla 12. Análisis de posibles factores asociados con la DmAM entre las características clínica de los pacientes con AR.** Los valores de beta que se muestran se obtuvieron considerando como referencia las mujeres para el sexo, no ser fumador para el tabaquismo, y la presencia de erosiones, FR o anticuerpos anti-CCP. Error Std.= Error estándar.

Para confirmar los resultados se utilizó una cohorte independiente de pacientes con AR y sus controles. Los datos de metilación fueron obtenidos por Liu *et al.*, con el Human Methylation 450 K Bead-Chip. Gracias a estos datos, se pudieron las DmAM de Horvath, de Hannum y de los 8 CpG. Se encontraron resultados inconsistentes entre las tres DmAM utilizados. La DmAM de 8CpGs mostró un envejecimiento en pacientes con AR. La misma tendencia se encontró utilizando la DmAM de Hannum si bien el resultado no alcanzaba el nivel de significación de 0.05. Sin embargo, la DmAM de Horvath mostró valores de DmAM significativamente menores en los pacientes con AR respecto a los controles (Tabla 13). Para excluir la heterogeneidad en la composición de células sanguíneas como factor de confusión en los análisis, se aplicó la corrección descrita por Houseman a las tres DmAM. Los análisis ajustados por subpoblaciones sanguíneas mostraron valores significativamente menores de DmAM en los pacientes con AR que en los controles en las tres DmAM. Las diferencias fueron pequeñas, todas inferiores a los dos años. El cambio introducido por este ajuste fue mínimo para la DmAM de Horvath, probablemente reflejando su insensibilidad a variación en la

composición sanguínea. Sin embargo, fue notable para las otras dos DmAM, lo que muestra su mayor sensibilidad a esta fuente de confusión. Estos resultados sugieren que la tendencia al envejecimiento prematuro observada en la sangre de los pacientes con AR con dos de las DmAM no puede distinguirse de efectos debidos a cambios en la composición sanguínea entre pacientes y controles. Por desgracia, la falta de información sobre los sitios CpG necesarios para aplicar esta corrección en los datos de nuestra colección de muestras impidió comprobar si el envejecimiento prematuro observado en esas muestras era debido al mismo tipo de factor de confusión.

| DmAM                         | $\Delta$ DmAM | IC 95%        | p-valor |
|------------------------------|---------------|---------------|---------|
| <b>8 CpGs Ajuste Básico</b>  | 0.74          | 0.2 a 1.28    | 0.005   |
| <b>Hannum Ajuste Básico</b>  | 0.42          | -0.23 a 1.07  | 0.18    |
| <b>Horvath Ajuste Básico</b> | -1.47         | -2.23 a -0.71 | 0.00007 |
| <b>8 CpGs Ajuste Total</b>   | -0.63         | -1.17 a -0.09 | 0.03    |
| <b>Hannum Ajuste Total</b>   | -0.72         | -1.38 a -0.06 | 0.04    |
| <b>Horvath Ajuste Total</b>  | -1.57         | -2.38 a -0.76 | 0.0002  |

**Tabla 13. Diferencias en las DmAM entre los pacientes con AR y los controles del estudio de validación analizadas con diferentes métodos.** Se utilizaron las tres DmAM mencionadas, ajustadas por sexo y edad o ajustadas además por el método de Houseman para variabilidad en la composición de las subpoblaciones sanguíneas (Total).  $\Delta$ DmAM = DmAM casos – DmAM controles.

### Acortamiento telomérico en la artritis reumatoide

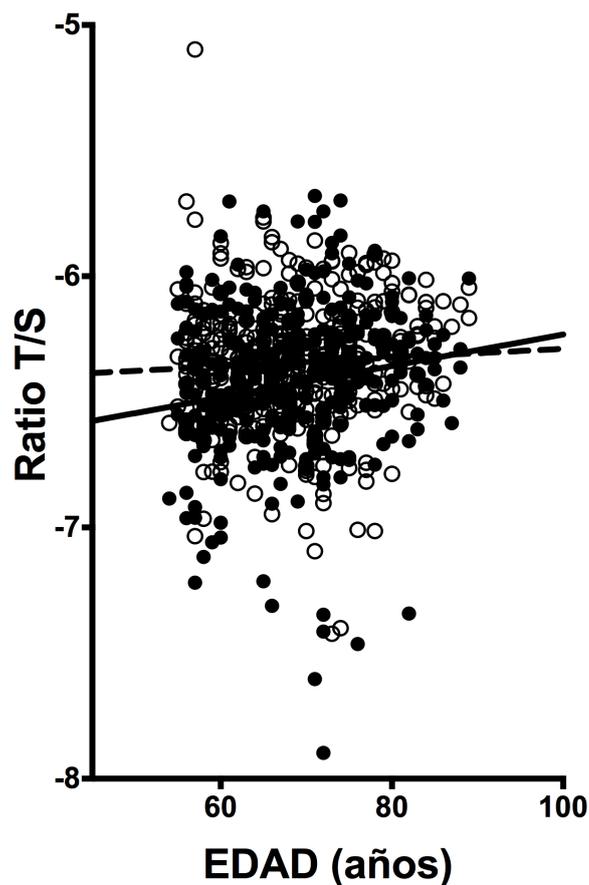
La longitud de los telómeros se determinó de forma relativa mediante qPCR de las 735 muestras de la cohorte de descubrimiento, previamente descritas. Los resultados superaron los criterios de control de calidad, incluyendo un CV medio de los duplicados de las muestras de 0.62% (rango = 0.00 a 4.95) para el amplicón telomérico y de 0.26% para el gen de referencia (rango = 0.00 a 2.29); así como CV entre los

distintos rotores de 3.7, 2.65 y 2.19% para el ratio T/S correspondiente a los calibradores de 160, 35 y 2 ng, respectivamente que disminuyeron hasta 1.07, 1.77 y 0.8%, respectivamente, tras la normalización de los rotores.

Los resultados mostraron una correlación positiva entre el ratio T/S y la edad cronológica (correlación de Spearman = 0.13; p = 0.0002) a pesar de que el rango de edad de los sujetos de esta cohorte es estrecho. Los hombres mostraron telómeros más cortos que las mujeres, pero sin alcanzar valores de p significativos (diferencia en la ratio T/S = 0.05, IC 95% = -0.0005 a 0.1). Se realizó un ANCOVA ajustando por sexo y edad como covariables. No se encontró un acortamiento telomérico significativo en los pacientes de AR e incluso éstos mostraron telómeros más largos que los controles tras ajustar por sexo y edad (Diferencia en la ratio T/S = -0.08, IC 95% = -0.13 a -0.03; p-valor = 0.005) (Figura 16). Sin embargo, ninguna característica clínica mostró asociación con la ratio T/S en los pacientes de AR, ni en el análisis conjunto (Tabla 14), ni tampoco en análisis univariantes corregidos por sexo y edad (datos no mostrados).

|                   | Ratio T/S  |            |                           |
|-------------------|------------|------------|---------------------------|
|                   | Beta valor | Error Std. | p-valor                   |
| <b>Intercepto</b> | -6,851     | 0,187      | < 1,0 x 10 <sup>-16</sup> |
| <b>Edad</b>       | 0,007      | 0,003      | 0,01                      |
| <b>Sexo</b>       | -0,016     | 0,029      | 0,59                      |
| <b>Tabaquismo</b> | -0,028     | 0,034      | 0,41                      |
| <b>Erosiones</b>  | -0,008     | 0,025      | 0,76                      |
| <b>FR</b>         | 0,024      | 0,027      | 0,37                      |
| <b>Anti-CCP</b>   | 0,023      | 0,026      | 0,39                      |

**Tabla 14. Análisis de la longitud de los telómeros en la sangre de los pacientes con AR. ANCOVA para el ratio T/S en relación a las características de los pacientes con AR.** Los valores de beta se refieren a mujeres para el sexo, no fumadores para el tabaquismo, y a presencia para las erosiones, el FR y los anticuerpos anti-CCP. Error Std.= Error estándar.



**Figura 16. Análisis del acortamiento telomérico con la edad en la sangre de los pacientes con AR y los controles.** Distribución de la ratio T/S en los pacientes con AR (puntos oscuros) y los controles (círculos huecos) en relación con la edad cronológica. Las líneas se corresponden con la regresión de mínimos cuadrados.

### **Estudio de mortalidad en pacientes con artritis reumatoide**

En estudios previos se ha relacionado la DmAM con un incremento del riesgo de mortalidad. Se realizó un análisis en nuestra cohorte de pacientes y controles ajustando por sexo, edad y hábito tabáquico. Un total de 364 pacientes que cumplen los criterios de clasificación de la ACR fueron incluidos en este análisis. Se inició la recogida de datos en 2001 hasta 2009 y se realizó un seguimiento de los hasta 2015. El tiempo medio de seguimiento fue de 114.85 meses (SD = 81.07). La media de personas año fue de 7063.69. Al final del estudio, 242 sujetos habían fallecido de un total de 738, lo que corresponde a un 33.24%. La tasa de mortalidad es de 42.27 % (IC = 33.04

a 54.08) en pacientes con AR y de 26.70 ‰ en pacientes (IC = 18.28 a 39.00). El riesgo relativo de los pacientes con AR mostró un incremento frente a controles después del ajuste (Tabla 15), observándose una mortalidad 1.86 veces mayor. Sin embargo, la edad biológica, tanto determinada mediante la DmAM de 8 CpGs como mediante la ratio T/S, no mostró asociación con el riesgo de mortalidad de los pacientes de AR.

|                                | Riesgo Relativo | IC 95% |      | p-valor                |
|--------------------------------|-----------------|--------|------|------------------------|
| <b>Edad</b>                    | 1,13            | 1,1    | 1,15 | $5,20 \times 10^{-30}$ |
| <b>Pacientes con AR</b>        | 1,86            | 1,42   | 2,42 | $4,79 \times 10^{-06}$ |
| <b>Sexo (femenino)</b>         | 1,4             | 1,09   | 1,83 | 0,01                   |
| <b><math>\Delta</math>DmAM</b> | 0,99            | 0,97   | 1,01 | 0,28                   |
| <b>Ratio T/S</b>               | 0,8             | 0,51   | 1,23 | 0,31                   |

**Tabla 15. Riesgo relativo de mortalidad en los pacientes con AR en relación con los controles sanos.** Los resultados fueron obtenidos en una regresión según el modelo de riesgo proporcional de Cox.

## DISCUSIÓN

Los resultados presentados reflejan los tres objetivos planteados y así van a ser discutidos. En primer lugar, se ha desarrollado y validado una medida de edad biológica basada en la metilación del ADN que permite el estudio de muchas muestras de sangre utilizando PCR y un secuenciador capilar de forma eficiente y exacta. Esta medida se ha utilizado en los otros dos objetivos. Así nos ha servido, junto a otros biomarcadores de envejecimiento, para analizar los componentes sistémico y local del envejecimiento prematuro en los pacientes con artrosis. Esta nueva medida de edad biológica nos ha permitido confirmar evidencias previas de envejecimiento en el cartílago de la articulación afectada, pero no fuera de esa localización. Estos resultados tienen implicaciones sobre la magnitud de la afectación en la artrosis. Por último, el análisis de los mismos biomarcadores de envejecimiento en muestras de sangre de pacientes con artritis reumatoide no ha demostrado envejecimiento acelerado consistente, lo que cuestiona algunos resultados previos y nos lleva a interpretar de una forma más restrictiva el aumento de mortalidad observado en estos pacientes.

### **Predicción de edad biológica mediante 8 sitios CpG**

En este trabajo hemos desarrollado una nueva medida de edad biológica (la DmAM de 8 CpG) apropiada para grandes estudios de muestras de sangre completa en sujetos adultos realizados en laboratorios que cuenten con un secuenciador de capilares.

Con esta DmAM se alcanzó un compromiso entre su facilidad para la aplicación a grandes tamaños muestrales y la precisión en la estimación de la edad biológica. Permite la detección de cambios en la edad epigenética ligeramente menos precisos que otros modelos desarrollados previamente pero que necesitan de una mayor inversión económica por muestra, pues requieren de la obtención de los niveles de

metilación mediante chips/arrays de metilación que determinan los niveles de metilación de sitios CpG repartidos a lo largo de todo el genoma [88], [94].

Además, este nuevo predictor da lugar a una estimación independiente de factores de confusión importantes a la hora de analizar la edad y fácilmente comparable con otras estimaciones obtenidas mediante otras tecnologías. Los arrays de metilación generan una gran cantidad de información útil que puede ser de interés para otro tipo de análisis, pero su coste es excesivo si el objetivo del estudio es únicamente el análisis de la edad biológica. Esta consideración ha dado lugar al desarrollo de nuevas DmAM con un bajo número de sitios CpG para estudios epidemiológicos que implican grandes tamaños muestrales y para la aplicación forense que tiene otras limitaciones adicionales como la cantidad de ADN [89], [307], [369], [392], [393].

Entre las DmAM que requieren un menor número de sitios CpG, esta nueva 8CpG DmAM mostró un mayor precisión la basada en 3 sitios CpG previamente descrita [369]. Desafortunadamente, no se ha podido establecer una comparación directa con otras DmAM de bajo número de CpGs debido a la falta de la información necesaria, bien porque los sitios CpG no se ensayan en los arrays de metilación o porque los parámetros del modelo no se han descrito públicamente para su aplicación [89], [392], [393]. Independientemente de la precisión, que consideraremos posteriormente, todas las demás DmAM basadas en menos de 8 CpGs están diseñadas para su ensayo mediante pirosecuenciación, que es una tecnología no disponible en muchos laboratorios. Además, la precisión de este tipo de DmAM se incrementa con la inclusión de sitios CpG adicionales [307], [369], pero cada nuevo CpG requiere de una nueva reacción de pirosecuenciación, que conlleva un mayor coste económico y de tiempo. Sin embargo, la tecnología MS-SNuPE tiene la ventaja de su naturaleza multiplex, permitiendo el análisis de los 8 sitios CpG de la nueva DmAM en una única reacción, reduciendo tanto el tiempo necesario como el coste del ensayo por muestra [388]. Hemos estimado que el análisis de los 8 CpG de la nueva DmAM requeriría de aproximadamente 32h de ensayo tras la modificación de ADN con bisulfito si se

utilizase pirosecuenciación, mientras que el MS-SNuPE requiere únicamente 8h y un equipamiento más ampliamente disponible en los laboratorios: un termociclador y un secuenciador de capilares.

Es importante destacar que la precisión de cualquier medida de edad biológica es ampliamente dependiente de la edad de los sujetos, y esta dependencia tiene dos componentes. El primero de ellos se debe a la diferencia entre la edad media de la cohorte de entrenamiento en la que se obtienen los parámetros del modelo y la edad del grupo que se va a estudiar. Las mejores estimaciones de edad se obtienen cerca de la media de la cohorte de entrenamiento, debido a que los parámetros de la regresión son los que mejor se ajustan a dicha cohorte. Esta dependencia supone un sesgo de los parámetros en otras colecciones de muestras diferentes de la cohorte de entrenamiento. El segundo componente se debe al rango de edades considerado, ya que afecta a los coeficientes de correlación como medidas de precisión. Debido a la propia fórmula del coeficiente de correlación, un rango mayor de edad da lugar a un coeficiente de correlación mayor que un rango más estrecho, a pesar de que ambos tengan la misma dispersión de los datos en torno a la línea de regresión. Además, el rango de edades afecta a la precisión debido a la diferente dinámica de los cambios de metilación durante el desarrollo, como ha sido previamente descrito [91], [94]. Esta variación implica una dificultad añadida a las DmAM que pretenden cubrir un amplio rango de edad que incluyen tanto la infancia como la edad adulta [94], [393]. Por ello, hemos restringido la nueva DmAM únicamente a la edad adulta. Esta aproximación es más conservadora que la asunción de una ratio constante en los cambios de metilación desde el nacimiento hasta la ancianidad, como se ha hecho en otros estudios previos [88], [307], [369], [392], [393]. Una aproximación alternativa y precisa es la que ha llevado a cabo Horvath, que consigue una precisión elevada en todos los rangos de edad gracias al uso un modelo de regresión elastic net que tiene en cuenta la diferente ratio de cambios de metilación antes y después de los 20 años [94].

Debido a todas las fuentes de variabilidad que influyen en la precisión de las DmAM anteriormente descritas, es necesario utilizar una misma cohorte de sujetos

para la comparación entre distintas DmAM, como hemos hecho en este estudio. Esto ha sido posible también gracias a una de las características ventajosas de la DmAM de 8 CpGs, ya que incluye sitios cuyo análisis es factible no solo mediante MS-SNuPE sino también disponibles en los arrays de metilación de Illumina, tanto 27K como 450K. Esto permite su comparación con otras DmAM basadas en sitios CpG de estos arrays.

Otra importante consideración a la hora de interpretar los resultados de la DmAM de 8 CpG es el grado de independencia de factores de confusión comunes [394]. En nuestros análisis, ha mostrado independencia del sexo y del hábito tabáquico, lo que podría resultar una ventaja sobre otros predictores cuyo resultados debe corregirse por estas variables para evitar posibles factores de confusión [88], [89]. Además, ha mostrado independencia de variación fisiológica en la composición sanguínea. Idealmente, las DmAM deberían ser completamente independientes de los cambios comúnmente observados en la composición sanguínea tanto asociados con la edad como con cualquier otra circunstancia. Nuestro análisis con las 92 muestras de la segunda cohorte de validación indica esta deseada independencia. Este es un test similar al aplicado a algunas de las otras DmAM [94], [369]. Sin embargo, nuestro estudio de muestras de pacientes con AR nos ha mostrado indicios claros de que las diferencias en composición sanguínea entre pacientes y controles tienen una repercusión mayor en los resultados. De forma más clara se demostró la influencia de la composición sanguínea en las DmAM de 8CpG y de Hannum, pero también se encontraron indicios de que podía afectar a la DmAM de Horvath. De confirmarse estos resultados indicarían que las DmAM se deben usar con prudencia en enfermedades que se asocien con alteraciones de la composición celular de la sangre. El resto de resultados obtenidos al usar la DmAM de 8 CpG en muestras de pacientes con artrosis y en los controles confirman que se ha obtenido la herramienta deseada: una DmAM con un equilibrio conveniente entre eficiencia y exactitud.

## Estudio de envejecimiento celular en pacientes con artrosis

Nuestros resultados muestran por primera vez un envejecimiento prematuro basado en cambios de metilación en el cartílago de articulaciones afectadas de pacientes con artrosis, pero no en el hueso subcondral de la articulación afectada o en células sanguíneas de pacientes con la enfermedad. Estos resultados suman el envejecimiento epigenético a la lista de mecanismos del envejecimiento que están ligadas al cartílago artrósico. Cada uno de estos mecanismos aporta información complementaria y evidencias no redundantes de diferentes aspectos del envejecimiento prematuro que tiene lugar en los condrocitos y la matriz extracelular de las articulaciones que desarrollan artrosis. Además, nuestros resultados cuestionan la implicación de un envejecimiento sistémico en la enfermedad, o incluso un envejecimiento local en toda la articulación, si bien deben explorarse otros factores del envejecimiento en el hueso subcondral para descartar completamente que el envejecimiento prematuro esté presente también en este tejido.

Previamente, se han encontrado varios mecanismos de envejecimiento biológico que están exacerbados en los condrocitos y el cartílago de los pacientes con artrosis [155], [316]. Añadir el envejecimiento epigenético no solo supone una nueva evidencia más, sino que demuestra la participación de cambios a nivel epigenético, lo que no se puede asumir simplemente observando evidencias de envejecimiento telomérico o de otro tipo [5], [7]. En efecto, los distintos mecanismos implicados en el envejecimiento y los cambios que resultan de esos mecanismos no tienen la misma repercusión en todas las situaciones o en todos los tejidos. Así se ha visto que la erosión de los telómeros es una característica que muestra diferencias entre los distintos tejidos del mismo individuo. Además, las enfermedades con envejecimiento prematuro en las que predomina un acortamiento de los telómeros son muy diferentes de las enfermedades en las que la característica principal es la inestabilidad genómica, a pesar de que ambas están interconectadas. En el primer grupo se incluyen la fibrosis pulmonar, la disqueratosis congénita y la anemia aplásica, mientras que en los síndromes progeroides como el Hutchinson-Gilford o el Werner la inestabilidad

genómica juega un papel más importante que en el acortamiento telomérico [5], [7]. En este mismo sentido se puede señalar que ya se ha demostrado que los cambios de metilación incluidos en la DmAM de Horvath son independientes de la senescencia celular y de la edad mitótica [94]. Una falta de redundancia similar se ha encontrado entre otros factores del envejecimiento. Por lo tanto, es necesario estudiar cada uno de ellos para conocer su implicación en el desarrollo de la artrosis o de otra enfermedad en la que se sospeche envejecimiento acelerado.

Los cambios epigenéticos relacionados con la edad no están restringidos a los cambios en los niveles de metilación. También incluyen las modificaciones de histonas y la remodelación de la cromatina, así como su regulación mediante las sirtuinas [7]. Ninguno de estos cambios se ha estudiado todavía en relación a la artrosis, pero son de un gran interés debido a su potencial reversibilidad mediante inhibidores de las desacetilasas de histonas o inhibidores de acetiltransferasas como posibles fármacos anti-edad [7]. El significado de estos cambios epigenéticos, sin embargo, está todavía muy poco estudiado. Parece que contribuyen a la pérdida de la regulación transcripcional incrementando la variabilidad o ruido en el nivel de expresión observado con la edad avanzada [5], [7]. Los cambios en la metilación del ADN están concentrados en algunas regiones funcionales, pero el patrón de hipermetilaciones e hipometilaciones no se ha ligado, por el momento, a un proceso molecular específico, y la mayoría de los cambios no están asociados a la expresión de genes [94], [369]. Por todo ello, no es posible especular sobre las posibles consecuencias de los cambios observados en el funcionamiento del cartílago.

La interpretación de estos cambios incluye también la magnitud en años de este cambio: el incremento de 3.7 años observado en el cartílago de pacientes con artrosis de este estudio es una aceleración del envejecimiento modesta, en comparación con los cambios observados en estudios de cáncer, pero similares a otros encontrados recientemente por otro grupo en el cartílago con artrosis en la cadera, lo cual supone una confirmación independiente de nuestros resultados [395]. Además, este nivel de envejecimiento muy probablemente tiene relevancia biológica. En este

sentido, se puede comparar con los observados en sangre de pacientes infectados con el virus del VIH, o con el síndrome de Down que son dos enfermedades con múltiples evidencias de envejecimiento biológico acelerado [75], [396].

Algunos de los mecanismos del envejecimiento previamente descritos en la artrosis tienen efectos mayores en el cartílago afectado y son menos evidentes en las áreas de cartílago preservado. Este es el caso del acortamiento telomérico [56], [57], [266], los cambios de la heterocromatina asociados a la senescencia [57], [266], o la positividad para la  $\beta$ -galactosidasa asociada también a la senescencia. Estos resultados se han interpretado, al menos en parte, como consecuencia del estrés celular de los condrocitos que desarrollan fenotipo senescente durante la artrosis. Sin embargo, es posible que la edad epigenética constituya un biomarcador de vulnerabilidad celular más que de daño, y por lo tanto, una diana potencial para el tratamiento. Será necesario llevar a cabo experimentos específicos para diferenciar ambos mecanismos.

Nuestros resultados son contrarios a la hipótesis de envejecimiento prematuro sistémico en la artrosis, dada la ausencia de este envejecimiento no solo en la sangre sino también en el hueso de la articulación afectada. Sin embargo, la única evidencia previa de envejecimiento sistémico es el estudio de acortamiento telomérico en sangre de pacientes con artrosis en la mano [58], y la metilación y la erosión de los telómeros son aspectos diferentes del envejecimiento, y por lo tanto, es probable que las distintas aproximaciones puedan dar lugar a diferentes hallazgos [7], [88], [94], [105], [397]. La longitud de los telómeros depende de las divisiones celulares, en ausencia de encima telomerasa, y del daño en el ADN provocado por factores extrínsecos como el estrés oxidativo o inflamatorio. El acortamiento telomérico encontrado en la artrosis es achacado a este estrés oxidativo y a bajos niveles de inflamación crónica [58], [398]. En contraste, la edad epigenética se cree que se debe a perturbaciones de los sistemas de regulación de la metilación.

Para poder descartar de forma concluyente el envejecimiento sistémico fue necesario el análisis de la longitud de los telómeros en las muestras de sangre de los

pacientes con artrosis y sus respectivos controles. Dado que ningún estudio ha replicado el hallazgo de Zhai y col. [58], existe la necesidad de replicar los resultados encontrados para validar o descartar la implicación del envejecimiento a nivel sistémico en la artrosis.

Nuestro estudio no encontró ninguna evidencia de acortamiento telomérico en las 890 muestras estudiadas. La correlación con la edad fue comparable a la encontrada en otros estudios de acortamiento telomérico en sangre, y posiblemente a la del estudio de Zhai, si bien no reportan el valor de correlación sino solo el número de pares de bases que disminuye por año y la significación de la misma ( $16 \pm 2$  pb;  $p < 0.001$ ) [58].

No encontramos asociación entre el acortamiento telomérico con la artrosis de mano, única estudiada en el trabajo de Zhai y col., ni con la de cadera o rodilla, que no habían sido previamente estudiadas. Además, tampoco encontramos asociación en el conjunto de las muestras de artrosis sin estratificar por articulación. Las diferencias encontradas en el estudio anterior indican un acortamiento de 281 pb en los pacientes con artrosis en la mano, que se reduce a 178 pb tras ajustar por las variables de confusión. Este acortamiento es equivalente a unos 11 años de envejecimiento si tenemos en cuenta la tasa de acortamiento por año que se describe en la cohorte. Sin embargo, otros estudios han mostrado una tasa mayor de acortamiento de los telómeros, entre 20 y 40 pb por año, con lo que reduciría a entre 9 y 4 años el envejecimiento de los pacientes con artrosis en la mano [399]. En cualquier caso, la magnitud del envejecimiento observado en el estudio de Zhai y colaboradores es llamativa. Podría explicar sin problemas el aumento de comorbilidades asociadas con el envejecimiento y de mortalidad observado en algunos estudios epidemiológicos [332]–[335]. Por otra parte, serían una indicación clara de un estado de fragilidad o debilidad sistémica como parte de la artrosis de mano. Precisamente por esta razón estos resultados tuvieron gran repercusión cuando fueron publicados. Además, como la tasa de erosión de los telómeros en condrocitos es semejante a la encontrada en sangre periférica, entre 22 y 40 pb al año [331], sería interesante comparar el

acortamiento en la sangre de los pacientes con el encontrado en condrocitos de pacientes con artrosis. Por desgracia, esto no es posible debido a la utilización de una técnica relativa en los dos estudios de longitud de los telómeros realizados hasta el momento [57], [58].

Solamente otro estudio, de Tamayo y colaboradores, ha abordado el análisis de la longitud de los telómeros en sangre periférica de pacientes con artrosis mediante la técnica de qPCR. Sin embargo, en este estudio se incluyen solamente 34 muestras sin estratificar por edad, por lo que a pesar de no encontrar diferencias significativas entre casos y controles, no puede considerarse como una validación definitiva [62].

Parece probable que las diferencias encontradas entre nuestros resultados y el estudio de Zhai y colaboradores puedan deberse a variabilidad entre las series de pacientes. Es muy probable que las series sean distintas, la nuestra basada en pacientes con artrosis clínicamente definida, la de Zhai y colaboradores basada en la utilización de radiografías como único criterio de inclusión [58]. Los cambios radiográficos característicos de la artrosis de manos son muy frecuentes con la edad avanzada, pero, a menudo, no están acompañados de la sintomatología característica de la artrosis [400]. Si estos cambios se pueden confundir con envejecimiento, como se sugiere por un biomarcador de edad biológica basado en el sistema de puntuación oseográfico [285], sería posible que se diese lugar al resultado observado por Zhai y colaboradores.

Por último en relación con este punto, la técnica de determinación de la longitud de los telómeros que hemos utilizado supone una limitación a la hora de comparar los resultados entre estudios. La técnica de qPCR permite únicamente un análisis relativo de la longitud de los telómeros entre las muestras estudiadas, haciendo imposible la comparación entre estudios. Esta es una limitación que no tiene el Southern blot que por su naturaleza permite comparaciones entre ensayos. Sin embargo, la cuantificación de la longitud, siempre difícil en el Southern blot, se ve complicada por el bandeo múltiple que se produce al analizar telómeros en

muestras de sangre completa. Por ello, la cuantificación con esta técnica tiene una limitada reproducibilidad y consistencia entre ensayos y entre laboratorios [301]. En nuestro estudio, intentamos aumentar la precisión y exactitud de los resultados aplicando todos los pasos detallados en el protocolo tanto en el diseño como en el análisis de los resultados. Dos factores muy importantes fueron la utilización de un robot para automatizar el proceso de pipeteado en todos los pasos de las qPCR y la utilización de replicados de cada muestra, lo que nos permitió repetir las muestras con elevados coeficientes de variación. De esta forma se aseguró que las determinaciones fueran altamente reproducibles, tanto a nivel de muestra entre replicados, como a nivel de ensayos entre rotores. Estas características aportan confianza en los resultados aunque no contribuyen a explicar la discordancia con el estudio de Zhai y colaboradores.

Por otro lado, la ausencia de una aceleración en la edad epigenética de la sangre y el hueso no se puede atribuir a la falta de potencia estadística. Nuestros análisis con la DmAM de 8 CpG en las muestras sanguíneas cuentan con suficiente poder estadístico para excluir un envejecimiento de la mitad de magnitud que el observado en cartílago ( $1 - \beta > 0.95$  para excluir una diferencia de 1.83 años para cada una de las comparaciones según articulación). El análisis de hueso con la DmAM de Horvath, sin embargo, es suficientemente potente como para detectar un envejecimiento de igual magnitud que el observado en cartílago ( $1 - \beta = 0.90$ ). Además, el uso de diferentes DmAM para los diferentes tejidos no ha interferido en el análisis debido a que en cada caso se han utilizado controles específicos para cada tejido, y no se han hecho comparaciones entre los diferentes tejidos. También se ha evitado el sesgo debido a diferencias en edad y sexo entre los grupos de pacientes y controles ajustando por ambas variables, como se recomienda en este tipo de estudios [88], [94], [369]. Además, la precisión del predictor de Horvath utilizada para la estimación de la edad biológica de cartílago es de 4 años, similar a la precisión de 8 CpG utilizado en sangre (5.07 años). Hay que tener en cuenta que en el caso de la DmAM de Horvath, el error absoluto medio (MAD) se ha estimado utilizando únicamente muestras incluidas en la cohorte de entrenamiento, mientras que en nuestro caso se

calcula en una cohorte de validación diferente a la de entrenamiento, lo que siempre incrementa los valores de MAD [94], [401].

Sin embargo, existen limitaciones en este estudio como la ausencia de muestras de diferentes tejidos del mismo individuo, que permitiría una estimación más precisa de la magnitud del envejecimiento prematuro del cartílago respecto a la edad biológica de otros tejidos del individuo; la ausencia de otros tejidos articulares, como el tejido sinovial, que podrían sufrir en mayor medida que el hueso los efectos del envejecimiento prematuro y finalmente un número mayor de muestras de cartílago de la cabeza femoral que permitiese un análisis específico de los pacientes con artrosis en la cadera. También hubiera sido deseable poder estudiar la longitud de los telómeros en muestras de tejidos, pues aunque no es la aplicación para la que esta técnica se ha validado de forma más extensa, hay antecedentes en cartílago artrósico y nos permitiría comparar distintas medidas de envejecimiento en las mismas muestras.

En resumen, hemos encontrado un envejecimiento prematuro, medido mediante metilación del ADN, específico del cartílago de las articulaciones afectadas por la artrosis. El conocimiento de los mecanismos de este tipo de medida del envejecimiento podría ayudar a entender en mayor profundidad esta patología. Sin embargo por el momento, lo único que puede concluirse acerca de los mecanismos de envejecimiento es que no actúan a nivel sistémico. Esto puede afirmarse debido a que se ha estudiado el envejecimiento mediante la metilación del ADN en el hueso próximo a la articulación afectada y en sangre de pacientes con artrosis y los resultados no muestran el envejecimiento encontrado en cartílago. Además, el envejecimiento sistémico se ha descartado también mediante el análisis de la longitud de los telómeros en sangre periférica de pacientes y controles. Sin embargo, no puede excluirse que otros mecanismos del envejecimiento pudiesen afectar de forma más extensa que los cambios en metilación y la longitud de los telómeros a diversos tejidos durante la artrosis. La ausencia de un envejecimiento sistémico en la artrosis reforzaría la hipótesis de acumulación de daños durante el envejecimiento que afecta

mayoritariamente al cartílago de la articulación dañada, siguiendo la teoría de uso y desgaste [402].

## **Estudio de envejecimiento celular en pacientes con artritis reumatoide**

Nuestro estudio no muestra indicios de un envejecimiento prematuro en las células sanguíneas de los pacientes con artritis reumatoide comparados con controles de la misma edad. Las dos medidas de edad biológica utilizadas, basadas en la metilación del ADN y en la longitud de los telómeros, nos llevan a esta conclusión aunque algunos resultados necesitan ser considerados con prudencia y resaltan la necesidad de considerar cuidadosamente todos los posibles factores de confusión.

En efecto, encontramos un envejecimiento prematuro en los pacientes con AR en la cohorte de descubrimiento utilizando la nueva DmAM de 8 CpG. El incremento observado de 1.9 años es pequeño pero claramente significativo, sin lugar a dudas, debido al considerable número de muestras analizadas. Sin embargo, hay toda una serie de evidencias que nos hacen cuestionar el significado de esta diferencia. Tanto la ausencia de correlación entre el envejecimiento prematuro encontrado y las características clínicas de los pacientes de AR, como la ausencia de contribución al riesgo incrementado de mortalidad de los mismos, sugieren que este incremento es biológicamente irrelevante a pesar de ser estadísticamente significativo. Pero la evidencia más importante y la única definitiva para dudar de este resultado es la obtenida del estudio de replicación.

En la cohorte de validación, los pacientes con AR muestran también un incremento de DmAM respecto a los controles con nuestra DmAM de 8CpG. Sin embargo, la DmAM de Hannum no alcanzó un resultado significativo y la de Horvath mostró la dirección opuesta. Estas dos DmAM no pudieron aplicarse en la colección de descubrimiento por falta de información en los sitios CpG necesarios. Los resultados contradictorios entre la DmAM de 8CpG y de la Horvath son especialmente llamativos

pues los dos fueron significativos, pero en sentido opuesto. Las diferencias podrían deberse a problemas de falta de precisión de las tres DmAM ya que son pequeñas en magnitud, 2.21 años entre las dos DmAM más diferentes, lo que entra dentro del error esperable y que no nos hubiese parecido digno de mención si se hubiesen obtenido en la misma dirección. Se puede pensar que diferencias en características clínicas y poblacionales entre la cohorte de replicación y la cohorte de descubrimiento podrían haber influido en estas discordancias ya que hay algunas que son notables. Así, todos los pacientes de Liu y colaboradores son anti-CCP positivos, pero sólo el 64 % en la cohorte de descubrimiento. Además la media de edad es unos 20 años menor en la cohorte de validación, y el porcentaje de fumadores es muy inferior en los pacientes de nuestro estudio. Sin embargo, la DmAM de 8 CpG mostró resultados similares en los dos estudios (envejecimiento acelerado en los pacientes), y ninguna de estas características diferentes entre las dos colecciones parece afectar a los resultados de las diferentes DmAM, ya sea cuando han sido analizadas en sus respectivos procesos de validación (excepto por los anticuerpos anti-CP), o en las muestras analizadas en este estudio.

La discordancia también nos llevó a considerar la variabilidad en composición sanguínea como posible causa. A priori, no parecía una buena explicación pues las tres DmAM habían sido validadas como insensibles a este tipo de variable. Sin embargo, los resultados obtenidos al aplicar la corrección de Houseman han mostrado que esa insensibilidad es probablemente relativa e insuficiente para los cambios en composición sanguínea asociados con la artritis reumatoide. De todas formas, parece que la DmAM de Horvath, que es la que valora más sitios CpG y la que ha sido validada en más tejidos, es la menos sensible a estos cambios. De hecho, sólo se observó una diferencia de 0.1 años entre el valor corregido y sin corregir, lo que es despreciable. Por el contrario, la DmAM de 8 CpG mostró un cambio de 1.37 años, y la desarrollada por Hannum y sus colaboradores de 1.14 años. Ninguna de estas diferencias es de magnitud preocupante y parecen compatibles con los resultados de las validaciones que mostraban su insensibilidad a este tipo de variabilidad. En nuestro caso, se han unido un tamaño muestral importante con un nivel de diferencia en la DmAM cercano

a 0 para resaltar estos efectos. Como detalle adicional, se puede comentar que en la corrección de Houseman tienen un peso importante las células NK que no están incluidas entre las poblaciones valoradas en la colección de validación del DmAM de 8 CpG. Sin embargo, estas células son poco abundantes en la sangre y no se han descrito cambios importantes en su frecuencia total en los pacientes con artritis reumatoide, por lo que es improbable que puedan explicar el factor de confusión por sí solas.

Por último, se debe comentar que la DmAM de Horvath aunque no cambia por efecto de la corrección muestra una diferencia significativa hacia un envejecimiento menor. Lo mismo le ocurre a la DmAM de 8 CpG tras corrección por composición sanguínea. Estos resultados sugieren la posibilidad de que además del problema del cambio en la composición sanguínea, la artritis reumatoide se acompañe de cambios en la metilación que produzcan un sesgo en los resultados de los DmAM. Este tipo de efecto es posible pues se ha observado una hipometilación predominante en algunas subpoblaciones sanguíneas de estos pacientes, así como cambios específicos en sitios CpG tanto hacia la disminución como hacia el aumento de la metilación [354]. En el momento actual, no se puede aventurar nada más pues haría falta validar los resultados en otras colecciones de muestras. En este sentido, es de lamentar que por la falta de información sobre los sitios CpG necesarios para la corrección por composición sanguínea de Houseman no podamos aplicarla a los resultados de la colección de descubrimiento. Aun así, interpretamos que el envejecimiento prematuro observado en esa colección de muestras no es genuino, sino probablemente debido al efecto de variación en la composición sanguínea una vez comprobado lo sucedido con la cohorte de replicación.

Los resultados obtenidos con el análisis de la longitud de los telómeros apoyan esta interpretación, pues en la misma colección de pacientes y controles no muestran acortamiento telomérico acelerado en los pacientes. Este es un argumento limitado pues, como ya se ha comentado, los distintos biomarcadores de envejecimiento pueden tener una sensibilidad diferente en distintos tejidos o enfermedades. Además, con anterioridad se ha descrito acortamiento telomérico acelerado en los pacientes

con AR que equivaldría a unos 20 años [361]. Esta cifra parece elevada, pues otras evidencias de posible envejecimiento no muestran una diferencia tan marcada, ni el aumento de mortalidad o incapacidad observados en la artritis reumatoide parecen compatibles con un efecto tan dramático. Otros estudios de poblaciones muy específicas de linfocitos, especialmente de linfocitos T, han encontrado signos de envejecimiento acelerado [61], [105][173]. Sin embargo, no parece que esos cambios específicos se reflejen a nivel de la sangre completa. Además, parecen tener lugar sólo en pacientes muy jóvenes, por debajo de los 40 años, una edad a la que sólo una fracción minoritaria de los pacientes han desarrollado la enfermedad.

El hecho de que los dos estudios mostrando acortamiento telomérico acelerado en los pacientes con artrosis de manos y con artritis reumatoide se hayan realizado por el mismo grupo y en la misma colección de sujetos (la cohorte de gemelos TwinsUK) indica la posibilidad de que haya alguna característica distintiva en esa colección o en los análisis realizados. Este comentario se aplica también a nuestros resultados, ya que la metodología utilizada para el estudio de los telómeros ha sido la misma en la artrosis y en la artritis reumatoide. Sin embargo, ni los casos, ni la mayor parte de los controles son compartidos entre nuestros dos estudios por lo que la peculiaridad de la población es menos probable. En cualquier caso, nos parece muy deseable que haya más grupos que analicen esta cuestión con independencia. No es que no haya sido analizada, sino que lo ha sido con estudios pequeños. En la artrosis, ya se ha comentado con anterioridad que sólo hay dos estudios pequeños, el de Zhai y sus colaboradores, y el nuestro que es el mayor realizado. Lo mismo sucede en la artritis reumatoide, solo hay estudios pequeños [61], [62], con excepción del realizado por el grupo de TwinsUK, y el nuestro que vuelve a ser el mayor número de muestras.

Uno de los aspectos más atractivos de los análisis de edad biológica lo constituye la interpretación de esa edad como un marcador del estado de salud en relación con el estado medio de la población de la misma edad cronológica. Por ello, parecía interesante comprobar si el aumento de la mortalidad que se observa en los pacientes con artritis reumatoide, y que hemos confirmado en nuestros pacientes,

tenía relación con un aumento de la edad biológica. No ha sido así. Esta ausencia de relación se debe contrastar con el claro incremento de mortalidad en los pacientes respecto a los controles de 1.86 veces. Este exceso de mortalidad muestra una tendencia a anularse, tras la aplicación de las nuevas terapias biológicas y el diagnóstico precoz de la enfermedad [403]–[405]. Pero todavía sigue estando elevado en la mayoría de los estudios. No hubiese sido sorprendente encontrar una asociación con la DmAM, ya que se han publicado estudios en los que la edad biológica así evaluada se ha asociado a un aumento de la mortalidad de un 11-21% en cohortes longitudinales de sujetos de avanzada edad [406]. También han encontrado asociación con la mortalidad otros estudios con otros diseños diferentes, bien longitudinales en la población general o de gemelos discordantes [407]. Sin embargo, todos estos estudios que han encontrado asociación tenían una gran potencia estadística, bien porque eran muy grandes, más de 4.500 sujetos, porque tenían carácter longitudinal, o porque al estudiar gemelos discordantes disminuyen mucho los factores de confusión. Por lo tanto, es posible que nuestro estudio carezca de la potencia estadística necesaria para revelar este tipo de asociación.

La relación de la longitud de los telómeros con la mortalidad es mucho más controvertida. Hay estudios que las han relacionado [408]–[410], pero otros no lo han hecho [411], [412]. Nuestros resultados se unen a este segundo grupo: no muestran asociación entre la longitud de los telómeros y la mortalidad, ni entre los pacientes, ni entre los controles. Si bien los pacientes de AR de nuestro estudio no presentan un acortamiento telomérico respecto a los controles, podría esperarse que tanto pacientes como controles con los telómeros más cortos tuviesen un riesgo incrementado de mortalidad. Pero no ha sido así. Es posible que también en este análisis el poder estadístico del estudio sea insuficiente. Sin embargo, las múltiples diferencias entre distintos estudios dificultan la identificación de un posible factor común que separe los estudios que encuentran asociación de los que no lo hacen, como el nuestro. Entre los posibles factores, se pueden incluir diferencias en la técnica de determinación del acortamiento, en las características de la población y en las metodologías de análisis.

En resumen de este apartado final, no hemos encontrado evidencias consistentes de un envejecimiento prematuro en la sangre de los pacientes con artritis reumatoide tras analizar dos marcadores de edad biológica: la metilación del ADN y la longitud de los telómeros. Se necesitará analizar la implicación de estos y otros biomarcadores de envejecimiento en las subpoblaciones sanguíneas específicas y en el tejido sinovial para clarificar el proceso de envejecimiento en la artritis reumatoide.





## CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado una nueva medida de la edad epigenética en muestras de sangre de individuos adultos basado en el análisis de la metilación en 8 sitios CpG. Esta medida supone un compromiso entre exactitud y conveniencia que permite el estudio de muchas muestras sin pérdida de la calidad de los resultados.
2. El análisis de pacientes con artrosis ha mostrado un envejecimiento epigenético prematuro de 3.7 años que es específico del cartílago de la articulación afectada .
3. No se han observado evidencias de un envejecimiento sistémico en los pacientes con artrosis en relación con la metilación del ADN, ni en la sangre de los pacientes con artrosis de mano, de rodilla o de cadera; ni en el hueso subcondral de los pacientes con artrosis de cadera.
4. No se ha observado acortamiento telomérico en la sangre de los pacientes con artrosis de mano, de rodilla o de cadera. Estos resultados, junto a los obtenidos con el análisis de la metilación del ADN, contradicen la hipótesis de un envejecimiento sistémico en los pacientes con artrosis.
5. No se han encontrado evidencias de envejecimiento biológicamente relevante en los pacientes con artritis reumatoide al analizar dos marcadores independientes de envejecimiento en muestras de sangre completa, la metilación del ADN y la longitud de los telómeros.
6. Se ha observado un aumento de la tasa de mortalidad de 1.86 veces en los pacientes con artritis reumatoide respecto a los controles, que no estaba relacionada con un envejecimiento prematuro evaluado como metilación del ADN o como acortamiento telomérico en muestras de sangre.



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. K. Lenhard, *Telomeres and Telomerase in Ageing, Disease, and Cancer*, 2008th ed. Springer, 2008.
- [2] B. B. de Jesus and M. a. Blasco, "Assessing cell and organ senescence biomarkers.," *Circ. Res.*, vol. 111, no. 1, pp. 97–109, 2012.
- [3] M. D. West and H. Vaziri, "Back to immortality: the restoration of embryonic telomere length during induced pluripotency.," *Regen. Med.*, vol. 5, no. 4, pp. 485–8, 2010.
- [4] R. S. Petralia, M. P. Mattson, and P. J. Yao, "Aging and longevity in the simplest animals and the quest for immortality," *Ageing Research Reviews*, vol. 16, no. 1. pp. 66–82, 2014.
- [5] N. Bhatia-Dey, R. R. Kanherkar, S. E. Stair, E. O. Makarev, and A. B. Csoka, "Cellular Senescence as the Causal Nexus of Aging.," *Front. Genet.*, vol. 7, p. 13, 2016.
- [6] A. D. Mooradian, "Biological and functional definition of the older patient: the role of biomarkers of aging.," *Oncology (Williston Park)*, vol. 6, no. 2 Suppl, pp. 39–44, Feb. 1992.
- [7] C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer, "The hallmarks of aging. TL - 153," *Cell*, vol. 153 VN-, no. 6, pp. 1194–1217, 2013.
- [8] J. R. Aunan, M. M. Watson, H. R. Hagland, and K. Søreide, "Molecular and biological hallmarks of ageing," *Br. J. Surg.*, vol. 103, no. 2, pp. e29–e46, 2016.
- [9] W. R. Jeck, A. P. Siebold, and N. E. Sharpless, "Review: A Meta-Analysis of GWAS Studies and Age-Associated Diseases," vol. 11, no. 5, pp. 727–731, 2012.
- [10] T. B. L. Kirkwood, "Understanding the odd science of aging," *Cell*, vol. 120, no. 4, pp. 437–447, 2005.
- [11] L. Hayflick, "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains," *Exp. Cell Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 614–636, 1965.
- [12] L. Hayflick and P. S. Moorhead, "The serial cultivation of human diploid cell strains.," *Exp. Cell Res.*, vol. 25, pp. 585–621, 1961.
- [13] B. Bernardes de Jesus, E. Vera, K. Schneeberger, A. M. Tejera, E. Ayuso, F. Bosch, and M. A. Blasco, "Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer," *EMBO Mol. Med.*, vol. 4, no. 8, pp. 691–704, 2012.
- [14] R. M. Naylor, D. J. Baker, and J. M. van Deursen, "Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases.," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 93, no. 1, pp. 105–16, 2013.
- [15] A. Aguilera and T. García-Muse, "Causes of genome instability.," *Annu. Rev.*

- Genet.*, vol. 47, pp. 1–32, 2013.
- [16] P. Oberdoerffer and D. a Sinclair, “The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 9, pp. 692–702, 2007.
- [17] J. Vijg and Y. Suh, “Genome instability and aging,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, pp. 645–68, 2013.
- [18] L. Szilard, “On The Nature Of The Aging Process,” *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 45, no. 1, pp. 30–45, 1959.
- [19] J. Vijg and M. E. T. Dolle, “Large genome rearrangements as a primary cause of aging,” *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 123, no. 8. pp. 907–915, 2002.
- [20] M. E. Dolle, H. Giese, C. L. Hopkins, H. J. Martus, J. M. Hausdorff, and J. Vijg, “Rapid accumulation of genome rearrangements in liver but not in brain of old mice,” *Nat Genet*, vol. 17, no. 4, pp. 431–434, 1997.
- [21] T. Lyama and D. M. Willson, “DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells,” *DNA Repair (Amst.)*, vol. 12, no. 8, pp. 620–36, 2013.
- [22] J. Nassour, S. Martien, N. Martin, E. Deruy, E. Tomellini, N. Malaquin, F. Bouali, L. Sabatier, N. Wernert, S. Pinte, E. Gilson, A. Pourtier, O. Pluquet, and C. Abbadie, “Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells,” *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 10399, 2016.
- [23] S. Katyal, S. F. el-Khamisy, H. R. Russell, Y. Li, L. Ju, K. W. Caldecott, and P. J. McKinnon, “TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair in neurons and is neuroprotective in vivo,” *EMBO J.*, vol. 26, no. 22, pp. 4720–31, 2007.
- [24] H. Date, O. Onodera, H. Tanaka, K. Iwabuchi, K. Uekawa, S. Igarashi, R. Koike, T. Hiroi, T. Yuasa, Y. Awaya, T. Sakai, T. Takahashi, H. Nagatomo, Y. Sekijima, I. Kawachi, Y. Takiyama, M. Nishizawa, N. Fukuhara, K. Saito, S. Sugano, and S. Tsuji, “Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene,” *Nat. Genet.*, vol. 29, no. 2, pp. 184–188, 2001.
- [25] T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, and R. A. Sharma, “DNA repair pathways as targets for cancer therapy,” *Nat Rev Cancer*, vol. 8, no. 3, pp. 193–204, 2008.
- [26] M. Muftuoglu, O. Junko, K. von Cayetano, C. Wen-Hsing, L. Dru F, and B. A. Vilhelm, “The clinical characteristics of Werner syndrome: molecular and biochemical diagnosis,” *Hum Genet*, vol. 124, no. 4, pp. 369–377, 2008.
- [27] M. Aggarwal, J. a Sommers, R. H. Shoemaker, and R. M. Brosh, “Inhibition of helicase activity by a small molecule impairs Werner syndrome helicase (WRN) function in the cellular response to DNA damage or replication stress,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 4, pp. 1525–1530, 2011.
- [28] D. K. Singh, P. Karmakar, M. Aamann, S. H. Schurman, A. May, D. L. Croteau, L. Burks, S. E. Plon, and V. A. Bohr, “The involvement of human RECQL4 in DNA

- double strand break repair," *Aging Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 358–371, 2010.
- [29] A. N. Suhasini and R. M. Brosh, "Fanconi anemia and Bloom's syndrome crosstalk through FANCD1-BLM helicase interaction," *October*, vol. 28, no. 1, pp. 7–13, 2012.
- [30] D. Iwasaki, K. Hayashihara, H. Shima, M. Higashide, M. Terasawa, S. M. Gasser, and M. Shinohara, "The MRX Complex Ensures NHEJ Fidelity through Multiple Pathways Including Xrs2-FHA-Dependent Tel1 Activation," *PLOS Genet.*, vol. 12, no. 3, p. e1005942, 2016.
- [31] A. Barzilai, G. Rotman, and Y. Shiloh, "ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 1, pp. 3–25, 2002.
- [32] V. Gorbunova, A. Seluanov, Z. Mao, and C. Hine, "Changes in DNA repair during aging," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 22, pp. 7466–7474, 2007.
- [33] H. C. Reinhardt and B. Schumacher, "The p53 network: Cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer," *Trends Genet.*, vol. 28, no. 3, pp. 128–136, 2012.
- [34] F. Rodier, J.-P. Coppe, C. K. Patil, W. A. Hoeijmakers, D. P. Muñoz, S. R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A. R. Davalos, and J. Campisi, "Persistent DNA damage signaling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion," *Nat Cell Biol*, vol. 11, no. 8, pp. 973–979, 2009.
- [35] I. Gonzalez-Suarez, A. B. Redwood, and S. Gonzalo, "Loss of A-type lamins and genomic instability," *Cell Cycle*, vol. 8, no. 23, pp. 3860–3865, 2009.
- [36] S. Vlcek and R. Foisner, "Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 19, no. 3, pp. 298–304, 2007.
- [37] K. H. Schreiber and B. K. Kennedy, "When lamins Go Bad: Nuclear Structure and Disease," *Cell*, vol. 152, no. 6, pp. 1365–75, 2013.
- [38] L. L. Bhusate, K. E. Herbert, D. L. Scott, and D. Perrett, "Increased DNA strand breaks in mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 51, no. 1, pp. 8–12, 1992.
- [39] L. Shao, H. Fujii, I. Colmegna, H. Oishi, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand, "Deficiency of the DNA repair enzyme ATM in rheumatoid arthritis.," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 6, pp. 1435–1449, 2009.
- [40] M. Tamayo, A. Mosquera, I. Rego, F. J. Blanco, J. Gosálvez, and J. L. Fernández, "Decreased length of telomeric DNA sequences and increased numerical chromosome aberrations in human osteoarthritic chondrocytes," *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 708, no. 1–2, pp. 50–58, 2011.
- [41] D. De Semir, M. Nosrati, S. Li, and M. Kashani-Sabet, "Telomerase: Going beyond the ends," *Cell Cycle*, vol. 6, no. 5, pp. 546–549, 2007.
- [42] P. Martínez and M. A. Blasco, "Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 3, pp. 161–176, 2011.

- [43] M. Blasco, "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 6, no. 8, pp. 611–22, 2005.
- [44] M. Armanios, J. K. Alder, E. M. Parry, B. Karim, M. A. Strong, and C. W. Greider, "Short Telomeres are Sufficient to Cause the Degenerative Defects Associated with Aging," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 85, no. 6, pp. 823–832, 2009.
- [45] M. A. Blasco, H. W. Lee, M. P. Hande, E. Samper, P. M. Lansdorp, R. A. DePinho, and C. W. Greider, "Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA.," *Cell*, vol. 91, no. 1, pp. 25–34, 1997.
- [46] E. Herrera, E. Samper, J. Mart??n-Caballero, J. M. Flores, H. W. Lee, and M. A. Blasco, "Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres," *EMBO J.*, vol. 18, no. 11, pp. 2950–2960, 1999.
- [47] S. L. Bakaysa, L. A. Mucci, P. E. Slagboom, D. I. Boomsma, G. E. Mcclern, B. Johansson, and N. L. Pedersen, "Telomere length predicts survival independent of genetic influences," *Aging Cell*, vol. 6, no. 6, pp. 769–774, 2007.
- [48] R. M. Cawthon, K. R. Smith, E. O'Brien, A. Sivatchenko, and R. A. Kerber, "Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older," *Lancet*, vol. 361, no. 9355, pp. 393–395, 2003.
- [49] M. Jaskelioff, F. L. Muller, J.-H. Paik, E. Thomas, S. Jiang, A. C. Adams, E. Sahin, M. Kost-Alimova, A. Protopopov, J. Cadiñanos, J. W. Horner, E. Maratos-Flier, and R. a. DePinho, "Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice.," *Nature*, vol. 469, no. 7328, pp. 102–6, 2011.
- [50] M. Armanios and E. H. Blackburn, "The telomere syndromes," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 10, pp. 693–704, 2012.
- [51] S. A. Savage, N. Giri, G. M. Baerlocher, N. Orr, P. M. Lansdorp, and B. P. Alter, "TINF2, a Component of the Shelterin Telomere Protection Complex, Is Mutated in Dyskeratosis Congenita," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 82, no. 2, pp. 501–509, 2008.
- [52] F. Zhong, S. A. Savage, M. Shkreli, N. Giri, L. Jessop, T. Myers, R. Chen, B. P. Alter, and S. E. Artandi, "Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita," *Genes Dev.*, vol. 25, no. 1, pp. 11–16, 2011.
- [53] T. Wang, S. C. Mei, R. Fu, H. Q. Wang, and Z. H. Shao, "Expression of shelterin component POT1 is associated with decreased telomere length and immunity condition in humans with severe aplastic anemia," *J. Immunol. Res.*, vol. 2014, 2014.
- [54] P. Martinez and M. A. Blasco, "Role of shelterin in cancer and aging," *Aging Cell*, vol. 9, no. 5, pp. 653–666, 2010.
- [55] A. Z. a Dehbi, T. R. D. J. Radstake, and J. C. a Broen, "Accelerated telomere shortening in rheumatic diseases: cause or consequence?," *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 9, no. 12, pp. 1193–204, 2013.
- [56] J. S. Price, J. G. Waters, C. Darrah, C. Pennington, D. R. Edwards, S. T. Donell, and I. M. Clark, "The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis.," *Aging Cell*,

- vol. 1, no. 1, pp. 57–65, 2002.
- [57] M. Harbo, L. Bendix, A.-C. Bay-Jensen, J. Graakjaer, K. Søre, T. L. Andersen, P. Kjaersgaard-Andersen, S. Koelvraa, and J.-M. Delaisse, “The distribution pattern of critically short telomeres in human osteoarthritic knees,” *Arthritis Res. Ther.*, vol. 14, no. 1, p. R12, 2012.
- [58] G. Zhai, a Aviv, D. J. Hunter, D. J. Hart, J. P. Gardner, M. Kimura, X. Lu, a M. Valdes, and T. D. Spector, “Reduction of leucocyte telomere length in radiographic hand osteoarthritis: a population-based study,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 65, no. 11, pp. 1444–1448, 2006.
- [59] E. a. Blinova, E. V. Zinnatova, M. S. Barkovskaya, V. I. Borisov, a. E. Sizikov, V. S. Kozhevnikov, N. B. Rubtsov, and V. a. Kozlov, “Telomere Length of Individual Chromosomes in Patients with Rheumatoid Arthritis,” *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 160, no. 6, pp. 779–782, 2016.
- [60] S. O. Schönland, C. Lopez, T. Widmann, J. Zimmer, E. Bryl, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand, “Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 23, pp. 13471–6, 2003.
- [61] K. Koetz, E. Bryl, K. Spickschen, W. M. O’Fallon, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand, “T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 16, pp. 9203–9208, 2000.
- [62] M. Tamayo, A. Mosquera, J. I. Rego, J. L. Fernández-Sueiro, F. J. Blanco, and J. L. Fernández, “Differing patterns of peripheral blood leukocyte telomere length in rheumatologic diseases,” *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 683, no. 1–2, pp. 68–73, 2010.
- [63] M. J. Ormseth, J. F. Solus, a. M. Oeser, a. Bian, T. Gebretsadik, a. Shintani, P. Raggi, and C. M. Stein, “Telomere Length and Coronary Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis,” *J. Rheumatol.*, 2016.
- [64] G. Taormina and M. G. Mirisola, “Longevity: Epigenetic and biomolecular aspects,” *Biomol. Concepts*, vol. 6, no. 2, pp. 105–117, 2015.
- [65] K. Luger, M. L. Dechassa, and D. J. Tremethick, “New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered or a disordered affair?,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 13, no. 7, pp. 436–447, 2013.
- [66] T. Suganuma and J. L. Workman, “Signals and combinatorial functions of histone modifications,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 80, pp. 473–499, 2011.
- [67] M. Blasco, “The epigenetic regulation of mammalian telomeres,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, no. 4, pp. 299–309, 2007.
- [68] G. Schotta, M. Lachner, K. Sarma, A. Ebert, R. Sengupta, G. Reuter, D. Reinberg, and T. Jenuwein, “A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin,” *Genes Dev.*, vol. 18, no. 11, pp. 1251–1262, 2004.
- [69] D. V. Firsanov, L. V. Solovjeva, and M. P. Svetlova, “H2AX phosphorylation at the

- sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues," *Clin. Epigenetics*, vol. 2, no. 2, pp. 283–297, 2011.
- [70] B. D. Price and A. D. D. Andrea, "Chromatin Remodeling at DNA Double Strand Breaks," *Cell*, vol. 152, no. 6, pp. 1344–1354, 2013.
- [71] W. Giblin, M. E. Skinner, and D. B. Lombard, "Sirtuins: Guardians of mammalian healthspan," *Trends Genet.*, vol. 30, no. 7, pp. 271–286, 2014.
- [72] M. Rodova, Q. Lu, Y. Li, B. G. Woodbury, J. D. Crist, B. M. Gardner, J. G. Yost, X. B. Zhong, H. C. Anderson, and J. Wang, "Nfat1 regulates adult articular chondrocyte function through its age-dependent expression mediated by epigenetic histone methylation," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 26, no. 8, pp. 1974–1986, 2011.
- [73] J. Gillespie, S. Savic, C. Wong, A. Hempshall, M. Inman, P. Emery, R. Grigg, and M. F. McDermott, "Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients," *Arthritis Rheum*, vol. 64, no. 2, pp. 418–422, 2012.
- [74] R. Higashiyama, S. Miyaki, S. Yamashita, T. Yoshitaka, G. Lindman, Y. Ito, T. Sasho, K. Takahashi, M. Lotz, and H. Asahara, "Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis," *Mod. Rheumatol.*, vol. 20, no. 1, p. 11, Feb. 2010.
- [75] Y. Wu, L. Chen, Y. Wang, W. Li, Y. Lin, D. Yu, L. Zhang, F. Li, and Z. Pan, "Overexpression of Sirtuin 6 suppresses cellular senescence and NF- $\kappa$ B mediated inflammatory responses in osteoarthritis development Material and Methods," *Nat. Publ. Gr.*, no. October, pp. 1–11, 2015.
- [76] Y. Fu, M. Kinter, J. Hudson, K. M. Humphries, R. S. Lane, J. R. White, M. Hakim, Y. Pan, E. Verdin, and T. M. Griffin, "Aging Promotes SIRT3-dependent Cartilage SOD2 Acetylation and Osteoarthritis," *Arthritis Rheumatol.*, p. n/a-n/a, 2016.
- [77] F. Antequera, "Structure, function and evolution of CpG island promoters," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 60, no. 8, pp. 1647–58, 2003.
- [78] H. Nagase and S. Ghosh, "Epigenetics: Differential DNA methylation in mammalian somatic tissues," *FEBS Journal*, vol. 275, no. 8. pp. 1617–1623, 2008.
- [79] P. Jintaridith, R. Tungtrongchitr, S. Preutthipan, and A. Mutirangura, "Hypomethylation of Alu Elements in Post-Menopausal Women with Osteoporosis," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e70386, 2013.
- [80] N. E. Lange, J. Sordillo, L. Tarantini, V. Bollati, D. Sparrow, P. Vokonas, A. Zanobetti, J. Schwartz, A. Baccarelli, A. A. Litonjua, and D. L. Demeo, "Alu and LINE-1 methylation and lung function in the normative ageing study," *BMJ Open*, vol. 2, no. 5, p. e001231-, 2012.
- [81] P. Jintaridith and a. Mutirangura, "Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences," *Physiol. Genomics*, vol. 41, no. February 2010, pp. 194–200, 2010.

- [82] B. C. Christensen, 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, "Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CPG island context," *PLoS Genet.*, vol. 5, no. 8, 2009.
- [83] H. Heyn, 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, "Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 26, pp. 10522–10527, 2012.
- [84] H. a Cruickshanks, T. McBryan, D. M. Nelson, N. D. Vanderkraats, P. P. Shah, J. van Tuyn, T. Singh Rai, C. Brock, G. Donahue, D. S. Dunican, M. E. Drotar, R. R. Meehan, J. R. Edwards, S. L. Berger, and P. D. Adams, "Senescent cells harbour features of the cancer epigenome," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 12, pp. 1495–506, 2013.
- [85] H. Heyn, S. Moran, and M. Esteller, "Aberrant DNA methylation profiles in the premature aging disorders Hutchinson-Gilford Progeria and Werner syndrome," *Epigenetics*, vol. 8, no. 1, pp. 28–33, 2013.
- [86] A. E. Teschendorff, 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, "Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer," *Genome Res.*, vol. 20, no. 4, pp. 440–446, 2010.
- [87] V. K. Rakyan, 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, "Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains," *Genome Res.*, vol. 20, no. 4, pp. 434–439, 2010.
- [88] G. Hannum, J. Guinney, L. Zhao, L. Zhang, G. Hughes, S. Satta, B. Klotzle, M. Bibikova, J. B. Fan, Y. Gao, R. Deconde, M. Chen, I. Rajapakse, S. Friend, T. Ideker, and K. Zhang, "Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates," *Mol. Cell*, vol. 49, no. 2, pp. 359–367, 2013.
- [89] I. Florath, K. Butterbach, H. Müller, M. Bewerunge-hudler, and H. Brenner, "Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: An epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 23, no. 5, pp. 1186–1201, 2014.
- [90] Z. Xu and J. a. Taylor, "Genome-wide age-related DNA methylation changes in blood and other tissues relate to histone modification, expression and cancer," *Carcinogenesis*, vol. 35, no. 2, pp. 356–364, 2014.
- [91] R. S. Alisch, B. G. Barwick, P. Chopra, L. K. Myrick, G. a. Satten, K. N. Conneely, and S. T. Warren, "Age-associated DNA methylation in pediatric populations,"

- Genome Res.*, vol. 22, no. 4, pp. 623–632, 2012.
- [92] Å. Johansson, S. Enroth, and U. Gyllensten, “Continuous Aging of the Human DNA Methylome Throughout the Human Lifespan,” *PLoS One*, vol. 8, no. 6, 2013.
- [93] K. Day, L. L. Waite, A. Thalacker-Mercer, A. West, M. M. Bamman, J. D. Brooks, R. M. Myers, and D. Absher, “Differential DNA methylation with age displays both common and dynamic features across human tissues that are influenced by CpG landscape,” *Genome Biol.*, vol. 14, no. 9, p. R102, 2013.
- [94] S. Horvath, “DNA methylation age of human tissues and cell types,” *Genome Biol.*, vol. 14, no. 10, p. R115, 2013.
- [95] T. Ronn, P. Poulsen, O. Hansson, J. Holmkvist, P. Almgren, P. Nilsson, T. Tuomi, B. Isomaa, L. Groop, A. Vaag, and C. Ling, “Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle,” *Diabetologia*, vol. 51, no. 7, pp. 1159–1168, 2008.
- [96] H. Tohgi, K. Utsugisawa, Y. Nagane, M. Yoshimura, Y. Genda, and M. Ukitsu, “Reduction with age in methylcytosine in the promoter region -224 approximately -101 of the amyloid precursor protein gene in autopsy human cortex,” *Brain Res. Mol. Brain Res.*, vol. 70, no. 2, pp. 288–292, Jul. 1999.
- [97] C. C. Oakes, D. J. Smiraglia, C. Plass, J. M. Trasler, and B. Robaire, “Aging results in hypermethylation of ribosomal DNA in sperm and liver of male rats,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 4, pp. 1775–1780, 2003.
- [98] L. M. Reynolds, J. Ding, J. R. Taylor, K. Lohman, N. Soranzo, A. de la Fuente, T. F. Liu, C. Johnson, R. G. Barr, T. C. Register, K. M. Donohue, M. V. Talor, D. Cihakova, C. Gu, J. Divers, D. Siscovick, G. Burke, W. Post, S. Shea, D. R. Jacobs, I. Hoeschele, C. E. McCall, S. B. Kritchevsky, D. Herrington, R. P. Tracy, and Y. Liu, “Transcriptomic profiles of aging in purified human immune cells,” *BMC Genomics*, vol. 16, no. 1, p. 333, 2015.
- [99] a Machwe, D. K. Orren, and V. a Bohr, “Accelerated methylation of ribosomal RNA genes during the cellular senescence of Werner syndrome fibroblasts,” *FASEB J.*, vol. 14, no. 12, pp. 1715–1724, 2000.
- [100] J. West, S. Beck, X. Wang, and A. E. Teschendorff, “An integrative network algorithm identifies age-associated differential methylation interactome hotspots targeting stem-cell differentiation pathways,” *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 1630, 2013.
- [101] V. Van Den Boom, S. M. Kooistra, M. Boesjes, B. Geverts, A. B. Houtsmuller, K. Monzen, I. Komuro, J. Essers, L. J. Drenth-Diephuis, and B. J. L. Eggen, “UTF1 is a chromatin-associated protein involved in ES cell differentiation,” *J. Cell Biol.*, vol. 178, no. 6, pp. 913–924, 2007.
- [102] M. F. Fraga, E. Ballestar, M. F. Paz, S. Roperio, F. Setien, M. L. Ballestar, D. Heine-Suñer, 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, “Epigenetic differences arise during the lifetime of

- monozygotic twins.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 30, pp. 10604–10609, 2005.
- [103] K. C. Jung and C. K. Sang, "Environmental effects on gene expression phenotype have regional biases in the human genome," *Genetics*, vol. 175, no. 4, pp. 1607–1613, 2007.
- [104] P. Garagnani, M. G. Bacalini, C. Pirazzini, D. Gori, C. Giuliani, D. Mari, A. M. Di Blasio, D. Gentilini, G. Vitale, S. Collino, S. Rezzi, G. Castellani, M. Capri, S. Salvioli, and C. Franceschi, "Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age," *Aging Cell*, vol. 11, no. 6, pp. 1132–1134, 2012.
- [105] A. E. Teschendorff, J. West, and S. Beck, "Age-associated epigenetic drift: Implications, and a case of epigenetic thrift?," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 22, no. R1, pp. 7–15, 2013.
- [106] A. Bird, "DNA methylation patterns and epigenetic memory," *Genes and Development*, vol. 16, no. 1, pp. 6–21, 2002.
- [107] R. M. Kohli and Y. Zhang, "TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation," *Nature*, vol. 502, no. 7472, pp. 472–479, 2013.
- [108] B. Rhead, C. Holingue, M. Cole, X. Shao, H. L. Quach, D. Quach, K. Shah, E. Sinclair, J. Graf, T. Link, R. Harrison, E. Rahmani, E. Halperin, W. Wang, G. S. Firestein, L. F. Barcellos, and L. A. Criswell, "Rheumatoid arthritis naïve T cells share hypermethylation sites with synoviocytes.," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, 2016.
- [109] C. J. Nile, C. R. Robert, A. Mohammed, W. D. Gordon, and G. W. Anthony, "Methylation status of a single CpG site in the <I>IL6</I> promoter is related to <I>IL6</I> messenger RNA levels and rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 58, no. 9, pp. 2686–2693, 2008.
- [110] W. den Hollander and I. Meulenbelt, "DNA methylation and osteoarthritis," *Curr. Genomics*, vol. 16, pp. 419–126, 2015.
- [111] M. D. Rushton, L. N. Reynard, M. J. Barter, R. Refaie, K. S. Rankin, D. A. Young, and J. Loughlin, "Characterization of the Cartilage DNA Methylome in Knee and Hip Osteoarthritis," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.j.)*, vol. 66, no. 9, pp. 2450–2460, Sep. 2014.
- [112] S. E. Castel and R. a Martienssen, "RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond.," *Nature reviews. Genetics*, vol. 14, no. 2, pp. 100–12, 2013.
- [113] J. L. Rinn and H. Y. Chang, "Genome regulation by long noncoding RNAs.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 81, pp. 145–166, 2012.
- [114] W. Y. Kim and N. E. Sharpless, "The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging," *Cell*, vol. 127, no. 2, pp. 265–275, 2006.
- [115] K. L. Yap, S. Li, A. M. Muñoz-cabello, S. Raguz, L. Zeng, J. Gil, M. J. Walsh, and M. Zhou, "Molecular Interplay of the Non-coding RNA ANRIL and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of INK4a,"

- Mol Cell*, vol. 38, no. 5, pp. 662–674, 2010.
- [116] A. Matheu, A. Maraver, M. Collado, I. Garcia-Cao, M. Canamero, C. Borrás, J. M. Flores, P. Klatt, J. Vina, and M. Serrano, “Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus,” *Aging Cell*, vol. 8, no. 2, pp. 152–161, Apr. 2009.
- [117] E. Pasmant, A. Sabbagh, M. Vidaud, and I. Bièche, “ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS,” *FASEB J.*, vol. 25, no. 2, pp. 444–448, 2011.
- [118] K. Abdelmohsen, A. Panda, M. J. Kang, J. Xu, R. Selimyan, J. H. Yoon, J. L. Martindale, S. De, W. H. Wood, K. G. Becker, and M. Gorospe, “Senescence-associated lncRNAs: Senescence-associated long noncoding RNAs,” *Aging Cell*, vol. 12, no. 5, pp. 890–900, 2013.
- [119] V. Sharma and T. Misteli, “Non-coding RNAs in DNA damage and repair,” *FEBS Letters*, vol. 587, no. 13, pp. 1832–1839, 2013.
- [120] C. Y. Lai, Y. T. Wu, S. L. Yu, Y. H. Yu, S. Y. Lee, C. M. Liu, W. S. Hsieh, H. G. Hwu, P. C. Chen, S. F. Jeng, and W. J. Chen, “Modulated expression of human peripheral blood microRNAs from infancy to adulthood and its role in aging,” *Aging Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 679–689, 2014.
- [121] S. Weilner, E. Schraml, H. Redl, R. Grillari-Voglauer, and J. Grillari, “Secretion of microvesicular miRNAs in cellular and organismal aging,” *Exp. Gerontol.*, vol. 48, no. 7, pp. 626–633, 2013.
- [122] T. Smith-Vikos, Z. Liu, C. Parsons, M. Gorospe, L. Ferrucci, T. M. Gill, and F. J. Slack, “A serum miRNA profile of human longevity: findings from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA),” *Aging (Albany NY)*, vol. 8, no. 11, pp. 2971–2983, Nov. 2016.
- [123] A. P. Ugalde, Y. Español, and C. López-Otín, “Micromanaging aging with miRNAs: New messages from the nuclear envelope,” *Nucleus*, vol. 2, no. 6, pp. 549–555, 2011.
- [124] A. Dallaire, C. Garand, E. R. Paquet, S. J. Mitchell, R. D. de Cabo, M. J. Simard, and M. Lebel, “Down regulation of miR-124 in both Werner syndrome DNA helicase mutant mice and mutant *Caenorhabditis elegans wrn-1* reveals the importance of this microRNA in accelerated aging,” *Aging (Albany NY)*, vol. 4, no. 9, pp. 636–647, 2012.
- [125] F. Olivieri, M. C. Albertini, M. Orciani, A. Ceka, M. Cricca, A. D. Procopio, and M. Bonafè, “DNA damage response (DDR) and senescence: shuttled inflammatory miRNAs on the stage of inflamm-aging,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 34, pp. 35509–35521, 2015.
- [126] M. J. Barter and D. A. Young, “Epigenetic mechanisms and non-coding rnas in osteoarthritis,” *Curr. Rheumatol. Rep.*, vol. 15, no. 9, 2013.
- [127] T. Ukai, M. Sato, H. Akutsu, A. Umezawa, and J. Mochida, “MicroRNA-199a-3p, microRNA-193b, and microRNA-320c are correlated to aging and regulate human cartilage metabolism,” *J. Orthop. Res.*, vol. 30, no. 12, pp. 1915–1922, 2012.

- [128] X. Li, F. Tian, and F. Wang, "Rheumatoid arthritis-associated microrna-155 targets socs1 and upregulates TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in PBMCs," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 12, pp. 23910–23921, 2013.
- [129] Q. Zhou, S. Haupt, J. T. Kreuzer, A. Hammitzsch, F. Proft, C. Neumann, J. Leipe, M. Witt, H. Schulze-Koops, and A. Skapenko, "Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, pp. 1–11, 2014.
- [130] E. T. Powers, R. I. Morimoto, A. Dillin, J. W. Kelly, and W. E. Balch, "Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, no. August, pp. 959–991, 2009.
- [131] W. E. Balch, R. I. Morimoto, A. Dillin, and J. W. Kelly, "Adapting proteostasis for disease intervention," *Science*, vol. 319, no. 5865, pp. 916–9, 2008.
- [132] J. Labbadia and R. I. Morimoto, "The Biology of Proteostasis in Aging and Disease," *Annu. Rev. Biochem. Biochem*, vol. 84, no. 1, pp. 435–464, 2015.
- [133] F. Gebauer and M. W. Hentze, "Molecular mechanisms of translational control," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. 10, pp. 827–835, 2004.
- [134] M. Hansen, S. Taubert, D. Crawford, N. Libina, S. J. Lee, and C. Kenyon, "Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*," *Aging Cell*, vol. 6, no. 1, pp. 95–110, 2007.
- [135] A. Chiocchetti, J. Zhou, H. Zhu, T. Karl, O. Haubenreisser, M. Rinnerthaler, G. Heeren, K. Oender, J. Bauer, H. Hintner, M. Breitenbach, and L. Breitenbach-Koller, "Ribosomal proteins Rpl10 and Rps6 are potent regulators of yeast replicative life span," *Exp. Gerontol.*, vol. 42, no. 4, pp. 275–286, 2007.
- [136] K. K. Steffen, V. L. MacKay, E. O. Kerr, M. Tsuchiya, D. Hu, L. A. Fox, N. Dang, E. D. Johnston, J. A. Oakes, B. N. Tchao, D. N. Pak, S. Fields, B. K. Kennedy, and M. Kaeberlein, "Yeast Life Span Extension by Depletion of 60S Ribosomal Subunits Is Mediated by Gcn4," *Cell*, vol. 133, no. 2, pp. 292–302, 2008.
- [137] R. I. Morimoto, "Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging," *Genes and Development*, vol. 22, no. 11, pp. 1427–1438, 2008.
- [138] M. J. Muñoz and D. L. Riddle, "Positive selection of *Caenorhabditis elegans* mutants with increased stress resistance and longevity," *Genetics*, vol. 163, no. 1, pp. 171–180, 2003.
- [139] A. Ben-Zvi, E. a Miller, and R. I. Morimoto, "Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 35, pp. 14914–14919, 2009.
- [140] A.-L. Hsu, C. T. Murphy, and C. Kenyon, "Regulation of Aging and Age-Related Disease by DAF-16 and Heat-Shock Factor," *Science (80-. )*, vol. 300, no. 5622, pp. 1142–1145, 2003.
- [141] J.-N. Min, R. A. Whaley, N. E. Sharpless, P. Lockyer, A. L. Portbury, and C. Patterson, "CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging

- phenotypes accompanied by altered protein quality control.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 12, pp. 4018–4025, 2008.
- [142] M. Schröder and R. J. Kaufman, "the Mammalian Unfolded Protein Response," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 74, no. 1, pp. 739–789, 2005.
- [143] A. V. Samuelson, C. E. Carr, and G. Ruvkun, "Gene activities that mediate increased life span of *C. elegans* insulin-like signaling mutants," *Genes Dev.*, vol. 21, no. 22, pp. 2976–2994, 2007.
- [144] A. Ciechanover, "Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 1, pp. 79–87, 2005.
- [145] D. a Ferrington, A. D. Husom, and L. V Thompson, "Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle.," *FASEB J.*, vol. 19, no. 6, pp. 644–646, 2005.
- [146] V. A. Vernace, L. Arnaud, T. Schmidt-Glenewinkel, and M. E. Figueiredo-Pereira, "Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*." *FASEB J.*, vol. 21, no. 11, pp. 2672–82, 2007.
- [147] I. Saez and D. Vilchez, "The Mechanistic Links Between Proteasome Activity, Aging and Age-related Diseases.," *Curr. Genomics*, vol. 15, no. 1, pp. 38–51, 2014.
- [148] V. Andersson, S. Hanzén, B. Liu, M. Molin, and T. Nyström, "Enhancing protein disaggregation restores proteasome activity in aged cells," *Aging (Albany. NY)*, vol. 5, no. 11, pp. 802–812, 2013.
- [149] C. Torres, L. Lewis, and V. J. Cristofalo, "Proteasome inhibitors shorten replicative life span and induce a senescent-like phenotype of human fibroblasts," *J. Cell. Physiol.*, vol. 207, no. 3, pp. 845–853, 2006.
- [150] U. Tomaru, S. Takahashi, A. Ishizu, Y. Miyatake, A. Gohda, S. Suzuki, A. Ono, J. Ohara, T. Baba, S. Murata, K. Tanaka, and M. Kasahara, "Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities," *Am. J. Pathol.*, vol. 180, no. 3, pp. 963–972, 2012.
- [151] L. Li, D. Zhao, H. Wei, L. Yao, Y. Dang, A. Amjad, J. Xu, J. Liu, L. Guo, D. Li, Z. Li, D. Zuo, Y. Zhang, J. Liu, S. Huang, C. Jia, L. Wang, Y. Wang, Y. Xie, J. Luo, B. Zhang, H. Luo, L. a Donehower, R. E. Moses, J. Xiao, B. W. O'Malley, and X. Li, "REGγ deficiency promotes premature aging via the casein kinase 1 pathway.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 27, pp. 11005–10, 2013.
- [152] D. C. Rubinsztein, G. Mariño, and G. Kroemer, "Autophagy and aging," *Cell*, vol. 146, no. 5, pp. 682–695, 2011.
- [153] W.-L. Yen and D. J. Klionsky, "How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging.," *Physiology*, vol. 23, no. 70, pp. 248–262, 2008.
- [154] A. Meléndez, Z. Tallóczy, M. Seaman, E.-L. Eskelinen, D. H. Hall, and B. Levine, "Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*." *Science*, vol. 301, no. 5638, pp. 1387–91, 2003.
- [155] M. Lotz and R. F. Loeser, "Effects of aging on articular cartilage homeostasis,"

- Bone*, vol. 51, no. 2. pp. 241–248, 2012.
- [156] C. a Martin, S. E. Carsons, R. Kowalewski, D. Bernstein, M. Valentino, and F. Santiago-Schwarz, "Aberrant extracellular and dendritic cell (DC) surface expression of heat shock protein (hsp)70 in the rheumatoid joint: possible mechanisms of hsp/DC-mediated cross-priming.," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 11, pp. 5736–42, 2003.
- [157] V. Goeb, M. Thomas-L'Otellier, R. Daveau, R. Charlionet, P. Fardellone, X. Le Loet, F. Tron, D. Gilbert, and O. Vittecoq, "Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes," *Arthritis Res Ther*, vol. 11, no. 2, p. R38, 2009.
- [158] L. Fontana, L. Partridge, and V. D. Longo, "Extending Healthy Life Span--From Yeast to Humans," *Science (80-. )*, vol. 328, no. 5976, pp. 321–326, 2010.
- [159] R. Martins, G. J. Lithgow, and W. Link, "Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity.," *Aging Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 196–207, Apr. 2016.
- [160] E. L. Greer and A. Brunet, "FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression.," *Oncogene*, vol. 24, no. 50, pp. 7410–7425, Nov. 2005.
- [161] A. Ortega-Molina, A. Efeyan, E. Lopez-Guadamillas, M. Muñoz-Martin, G. Gómez-López, M. Casanueva, F. Mulero, J. Pastor, S. Martinez, E. Romanos, M. Mar Gonzalez-Barroso, E. Rial, A. M. Valverde, J. R. Bischoff, and M. Serrano, "Pten positively regulates brown adipose function, energy expenditure, and longevity," *Cell Metab.*, vol. 15, no. 3, pp. 382–394, 2012.
- [162] L. C. Foukas, B. Bilanges, L. Betti, W. Pearce, K. Ali, S. Sancho, D. J. Withers, and B. Vanhaesebroeck, "Long-term p110 $\alpha$  PI3K inactivation exerts a beneficial effect on metabolism," *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, no. 4, pp. 563–571, 2013.
- [163] G. a Garinis, G. T. J. van der Horst, J. Vijg, and J. H. J. Hoeijmakers, "DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 11, pp. 1241–1247, 2008.
- [164] S. Alers, a. S. Loffler, S. Wesselborg, and B. Stork, "Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 32, no. 1, pp. 2–11, 2012.
- [165] S. C. Johnson, P. S. Rabinovitch, and M. Kaeberlein, "mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease," *Nature*, vol. 493, no. 7432, pp. 338–345, 2013.
- [166] D. W. Lamming, L. Ye, P. Katajisto, M. D. Goncalves, M. Saitoh, D. M. Stevens, J. G. Davis, A. B. Salmon, A. Richardson, R. S. Ahima, D. A. Guertin, D. M. Sabatini, and J. A. Baur, "Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity.," *Science*, vol. 335, no. 6076, pp. 1638–43, 2012.
- [167] D. E. Harrison, R. Strong, Z. D. Sharp, J. F. Nelson, C. M. Astle, K. Flurkey, N. L. Nadon, J. E. Wilkinson, K. Frenkel, C. S. Carter, M. Pahor, M. A. Javors, E. Fernandez, and R. A. Miller, "Rapamycin fed late in life extends lifespan in

- genetically heterogeneous mice.," *Nature*, vol. 460, no. 7253, pp. 392–5, 2009.
- [168] C. Selman, J. M. A. Tullet, D. Wieser, E. Irvine, S. J. Lingard, A. I. Choudhury, M. Claret, H. Al-Qassab, D. Carmignac, F. Ramadani, A. Woods, I. C. A. Robinson, E. Schuster, R. L. Batterham, S. C. Kozma, G. Thomas, D. Carling, K. Okkenhaug, J. M. Thornton, L. Partridge, D. Gems, and D. J. Withers, "Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span.," *Science*, vol. 326, no. 5949, pp. 140–4, 2009.
- [169] J. T. Rodgers, C. Lerin, W. Haas, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman, and P. Puigserver, "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1," *Nature*, vol. 434, no. 7029, pp. 113–118, 2005.
- [170] P. J. Fernandez-Marcos and J. Auwerx, "Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis," in *American Journal of Clinical Nutrition*, 2011, vol. 93, no. 4.
- [171] N. L. Price, A. P. Gomes, A. J. Y. Ling, F. V. Duarte, A. Martin-Montalvo, B. J. North, B. Agarwal, L. Ye, G. Ramadori, J. S. Teodoro, B. P. Hubbard, A. T. Varela, J. G. Davis, B. Varamini, A. Hafner, R. Moaddel, A. P. Rolo, R. Coppari, C. M. Palmeira, R. De Cabo, J. A. Baur, and D. A. Sinclair, "SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function," *Cell Metab.*, vol. 15, no. 5, pp. 675–690, 2012.
- [172] F. Petursson, M. Husa, R. June, M. Lotz, R. Terkeltaub, and R. Liu-Bryan, "Linked decreases in liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase activity modulate matrix catabolic responses to biomechanical injury in chondrocytes," *Arthritis Res Ther*, vol. 15, no. 4, p. R77, 2013.
- [173] P. Chalan, B. Kroesen, L. Brouwer, and A. Boots, "Rheumatoid Arthritis, Immunosenescence and the Hallmarks of Aging," *Curr. Aging Sci.*, no. 8, pp. 131–146, 2015.
- [174] D. R. Green, L. Galluzzi, and G. Kroemer, "Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging," *Science (80-. )*, vol. 333, no. 6046, pp. 1109–1112, 2011.
- [175] S. Melov, S. R. Doctrow, J. a Schneider, J. Haberson, M. Patel, P. E. Coskun, K. Huffman, D. C. Wallace, and B. Malfroy, "Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics.," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 21, pp. 8348–8353, 2001.
- [176] K. Kirby, J. Hu, A. J. Hilliker, and J. P. Phillips, "RNA interference-mediated silencing of *Sod2* in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 25, pp. 16162–16167, 2002.
- [177] Y. Wang and S. Hekimi, "Mitochondrial dysfunction and longevity in animals: Untangling the knot," *Science (80-. )*, vol. 350, no. 6265, pp. 1204–1207, 2015.
- [178] M. Vermulst, J. Wanagat, G. C. Kujoth, J. H. Bielas, P. S. Rabinovitch, T. A. Prolla, and L. A. Loeb, "DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in

- mitochondrial mutator mice.," *Nat. Genet.*, vol. 40, no. 4, pp. 392–394, 2008.
- [179] C. B. Park and N.-G. Larsson, "Mitochondrial DNA mutations in disease and aging.," *J. Cell Biol.*, vol. 193, no. 5, pp. 809–18, 2011.
- [180] G. C. Kujoth, P. C. Bradshaw, S. Haroon, and T. A. Prolla, "The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging," *PLoS Genetics*, vol. 3, no. 2. pp. 0161–0173, 2007.
- [181] S. L. Hebert, I. R. Lanza, and K. S. Nair, "Mitochondrial DNA alterations and reduced mitochondrial function in aging," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 131, no. 7–8, pp. 451–462, 2010.
- [182] H. Tynismaa, K. P. Mjosund, S. Wanrooij, I. Lappalainen, E. Ylikallio, A. Jalanko, J. N. Spelbrink, A. Paetau, and A. Suomalainen, "Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 49, pp. 17687–92, 2005.
- [183] Y. S. Yoon, D. S. Yoon, I. K. Lim, S. H. Yoon, H. Y. Chung, M. Rojo, F. Malka, M. J. Jou, J. C. Martinou, and G. Yoon, "Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: Involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1," *J. Cell. Physiol.*, vol. 209, no. 2, pp. 468–480, 2006.
- [184] Y.-Y. Park, S. Lee, M. Karbowski, A. Neutzner, R. J. Youle, and H. Cho, "Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1.," *J. Cell Sci.*, vol. 123, pp. 619–626, 2010.
- [185] S. Lee, S. Y. Jeong, W. C. Lim, S. Kim, Y. Y. Park, X. Sun, R. J. Youle, and H. Cho, "Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 31, pp. 22977–22983, 2007.
- [186] P. Stockl, E. Hutter, W. Zwerschke, and P. Jansen-Durr, "Sustained inhibition of oxidative phosphorylation impairs cell proliferation and induces premature senescence in human fibroblasts," *Exp Gerontol*, vol. 41, no. 7, pp. 674–682, 2006.
- [187] N. M. Borradaile and G. J. Pickering, "Nicotinamide phosphoribosyltransferase imparts human endothelial cells with extended replicative lifespan and enhanced angiogenic capacity in a high glucose environment," *Ageing Cell*, vol. 8, no. 2, pp. 100–112, 2009.
- [188] E. Itakura, C. Kishi-Itakura, I. Koyama-Honda, and N. Mizushima, "Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. 6, pp. 1488–1499, 2012.
- [189] M. Lazarou, D. A. Sliter, L. A. Kane, S. A. Sarraf, C. Wang, J. L. Burman, D. P. Sideris, A. I. Fogel, and R. J. Youle, "The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy," *Nature*, vol. 524, no. 7565, pp. 309–14, 2015.
- [190] C. Quijano, L. Cao, M. M. Fergusson, H. Romero, J. Liu, S. Gutkind, I. I. Rovira, R.

- P. Mohney, E. D. Karoly, and T. Finkel, "Oncogene-induced senescence results in marked metabolic and bioenergetic alterations," *Cell Cycle*, vol. 11, no. 7, pp. 1383–1392, 2012.
- [191] R. D. Martinus, G. P. Garth, T. L. Webster, P. Cartwright, D. J. Naylor, P. B. Høj, and N. J. Hoogenraad, "Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome," *Eur. J. Biochem.*, vol. 240, no. 1, pp. 98–103, 1996.
- [192] Q. Zhao, J. Wang, I. V. Levichkin, S. Stasinopoulos, M. T. Ryan, and N. J. Hoogenraad, "A mitochondrial specific stress response in mammalian cells," *EMBO J.*, vol. 21, no. 17, pp. 4411–4419, 2002.
- [193] A. Bolinches-Amorós, B. Mollá, D. Pla-Martín, F. Palau, and P. González-Cabo, "Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, no. May, p. 124, 2014.
- [194] C. Wiel, H. Lallet-Daher, D. Gitenay, B. Gras, B. Le Calvé, A. Augert, M. Ferrand, N. Prevarskaya, H. Simonnet, D. Vindrieux, and D. Bernard, "Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence," *Nat. Commun.*, vol. 5, no. May, pp. 3792–3793, 2014.
- [195] T. Arnould, S. Vankoningsloo, P. Renard, a. Houbion, N. Ninane, C. Demazy, J. Remacle, and M. Raes, "Creb activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation," *EMBO J.*, vol. 21, no. 1–2, pp. 53–63, 2002.
- [196] K. Ayub and M. B. Hallett, "Signalling shutdown strategies in aging immune cells," *Aging Cell*, vol. 3, no. 4, pp. 145–149, 2004.
- [197] L. C. Harty, M. Biniiecka, J. O'Sullivan, E. Fox, K. Mulhall, D. J. Veale, and U. Fearon, "Mitochondrial mutagenesis correlates with the local inflammatory environment in arthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 71, no. 4, pp. 582–588, 2012.
- [198] F. J. Blanco, I. Rego, and C. Ruiz-Romero, "The role of mitochondria in osteoarthritis," *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 7, no. 3, pp. 161–169, 2011.
- [199] W. Hui, D. a Young, A. D. Rowan, X. Xu, T. E. Cawston, and C. J. Proctor, "Oxidative changes and signalling pathways are pivotal in initiating age-related changes in articular cartilage," *Ann. Rheum. Dis.*, pp. 1–10, 2014.
- [200] M. N. Valcárcel-Ares, R. R. Riveiro-Naveira, C. Vaamonde-García, J. Loureiro, L. Hermida-Carballo, F. J. Blanco, and M. J. López-Armada, "Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes," *Rheumatol. (United Kingdom)*, vol. 53, no. 7, pp. 1332–1343, 2014.
- [201] I. K. Yoon, H. K. Kim, Y. K. Kim, I.-H. Song, W. Kim, S. Kim, S.-H. Baek, J. H. Kim, and J.-R. Kim, "Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology," *Exp. Gerontol.*, vol. 39, pp. 1369–1378, 2004.

- [202] F. Rodier and J. Campisi, "Four faces of cellular senescence," *Journal of Cell Biology*, vol. 192, no. 4, pp. 547–556, 2011.
- [203] T. Pascal, F. Debacq-Chainiaux, A. Chrétien, C. Bastin, A. F. Dabée, V. Bertholet, J. Remacle, and O. Toussaint, "Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays," *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 17, pp. 3651–3659, 2005.
- [204] E. S. Gonos, "Expression of the growth arrest specific genes in rat embryonic fibroblasts undergoing senescence.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 851, pp. 466–469, Jun. 1998.
- [205] T. Matsumura, Z. Zerrudo, and L. Hayflick, "Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology.," *J. Gerontol.*, vol. 34, no. 3, pp. 328–334, 1979.
- [206] R. J. Pignolo, M. O. Rotenberg, and V. J. Cristofalo, "Alterations in contact and density-dependent arrest state in senescent WI-38 cells," *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, vol. 30, no. 7, pp. 471–476, 1994.
- [207] R. Marcotte, C. Lacelle, and E. Wang, "Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 125, no. 10–11 SPEC. ISS., pp. 777–783, 2004.
- [208] B. Hampel, M. Wagner, D. Teis, W. Zwerschke, L. A. Huber, and P. Jansen-D??rr, "Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3," *Aging Cell*, vol. 4, no. 6, pp. 325–330, 2005.
- [209] F. d'Adda di Fagagna, P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter, and S. P. Jackson, "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence.," *Nature*, vol. 426, no. 6963, pp. 194–198, 2003.
- [210] U. Herbig, W. A. Jobling, B. P. C. Chen, D. J. Chen, and J. M. Sedivy, "Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21 CIP1, but not p16 INK4a," *Mol. Cell*, vol. 14, no. 4, pp. 501–513, 2004.
- [211] C. J. Sherr and J. M. Roberts, "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.," *Genes Dev.*, vol. 13, no. 12, pp. 1501–1512, 1999.
- [212] F. Zindy, H. Soares, J. Morgan, and M. F. Roussel, "Expression of INK4 Inhibitors of Cyclin during Mouse Brain Development1 Kinases," *Cell Growth & Differentiation*, vol. 8, no. November, pp. 1139–1150, 1997.
- [213] G. P. Nielsen, A. O. Stemmer-Rachamimov, J. Shaw, J. E. Roy, J. Koh, and D. N. Louis, "Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues.," *Lab. Invest.*, vol. 79, no. 9, pp. 1137–43, 1999.
- [214] J. Krishnamurthy, C. Torrice, M. R. Ramsey, G. I. Kovalev, K. Al-regaiey, L. Su, and N. E. Sharpless, "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging," *J. Clin. Invest.*, vol. 114, no. 9, pp. 1299–1307, 2004.
- [215] S. Drayton and G. Peters, "Immortalisation and transformation revisited,"

- Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 12, no. 1. pp. 98–104, 2002.
- [216] W. E. Wright and J. W. Shay, “Historical claims and current interpretations of replicative aging.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 20, no. 7, pp. 682–688, 2002.
- [217] M. Collado, M. A. Blasco, and M. Serrano, “Cellular Senescence in Cancer and Aging,” *Cell*, vol. 130, no. 2. pp. 223–233, 2007.
- [218] T. B. Kirkwood and S. N. Austad, “Why do we age?,” *Nature*, vol. 408, no. 6809, pp. 233–238, 2000.
- [219] J. Campisi, “Suppressing cancer: the importance of being senescent.,” *Science*, vol. 309, no. 5736, pp. 886–887, Aug. 2005.
- [220] B. G. Childs, D. J. Baker, J. L. Kirkland, J. Campisi, and J. M. Van Deursen, “Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?,” *EMBO J.*, vol. 15, no. 11, pp. 1139–1153, 2014.
- [221] W. Xue, L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, and S. W. Lowe, “Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas.,” *Nature*, vol. 445, no. 7128, pp. 656–60, 2007.
- [222] A. Freund, A. V. Orjalo, P. Y. Desprez, and J. Campisi, “Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences,” *Trends in Molecular Medicine*, vol. 16, no. 5. pp. 238–246, 2010.
- [223] D. Röhme, “Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 8, pp. 5009–5013, 1981.
- [224] G. M. Martin, “Syndromes of accelerated aging.,” *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, vol. 60, pp. 241–7, 1982.
- [225] U. Herbig, M. Ferreira, L. Condel, D. Carey, and J. M. Sedivy, “Cellular senescence in aging primates,” *Science (80-. )*, vol. 311, no. 5765, p. 1257, 2006.
- [226] D. J. Baker, T. Wijshake, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland, and J. M. van Deursen, “Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders.,” *Nature*, vol. 479, no. 7372, pp. 232–6, 2011.
- [227] O. Moiseeva, F. A. Mallette, U. K. Mukhopadhyay, A. Moores, and G. Ferbeyre, “DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 17, no. 4, pp. 1583–92, 2006.
- [228] A. Salminen, J. Ojala, and K. Kaarniranta, “Apoptosis and aging: Increased resistance to apoptosis enhances the aging process,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, no. 6, pp. 1021–1031, 2011.
- [229] K. Taniguchi, H. Kohsaka, N. Inoue, Y. Terada, H. Ito, K. Hirokawa, and N. Miyasaka, “Induction of the p16INK4a senescence gene as a new therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis [see comments],” *Nat Med*, vol. 5, no. 7, pp. 760–767, 1999.
- [230] I. Colmegna, A. Diaz-Borjon, H. Fujii, L. Schaefer, J. J. Goronzy, and C. M.

- Weyand, "Defective proliferative capacity and accelerated telomeric loss of hematopoietic progenitor cells in rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 58, no. 4, pp. 990–1000, 2008.
- [231] D. Philipot, D. Guérit, D. Platano, P. Chuchana, E. Olivotto, F. Espinoza, A. Dorandeu, Y.-M. Pers, J. Piette, R. M. Borzi, C. Jorgensen, D. Noel, and J.-M. Brondello, "p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 16, no. 1, p. R58, 2014.
- [232] R. F. Loeser, J. A. Collins, and B. O. Diekman, "Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis," *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 12, no. 7, pp. 412–420, 2016.
- [233] C. M. Verfaillie, M. F. Pera, and P. M. Lansdorp, "Stem cells: hype and reality.," *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, pp. 369–391, 2002.
- [234] V. Korinek, N. Barker, P. Moerer, E. van Donselaar, G. Huls, P. J. Peters, and H. Clevers, "Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4.," *Nat. Genet.*, vol. 19, no. 4, pp. 379–383, Aug. 1998.
- [235] P. H. Jones and F. M. Watt, "Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression.," *Cell*, vol. 73, no. 4, pp. 713–724, May 1993.
- [236] K. Urbanek, F. Quaini, G. Tasca, D. Torella, C. Castaldo, B. Nadal-Ginard, A. Leri, J. Kajstura, E. Quaini, and P. Anversa, "Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 18, pp. 10440–5, 2003.
- [237] J. Yui, C. P. Chiu, and P. M. Lansdorp, "Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow.," *Blood*, vol. 91, no. 9, pp. 3255–3262, 1998.
- [238] Y. Yi, A. Shepard, F. Kittrell, B. Mulac-Jericovic, D. Medina, and T. K. Said, "p19ARF determines the balance between normal cell proliferation rate and apoptosis during mammary gland development," *Mol Biol Cell*, vol. 15, no. 5, pp. 2302–2311, 2004.
- [239] J. Oh, Y. D. Lee, and A. J. Wagers, "Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities," *Nat. Med.*, vol. 20, no. 8, pp. 870–880, 2014.
- [240] S. Salani, C. Donadoni, F. Rizzo, N. Bresolin, G. P. Comi, and S. Corti, "Generation of skeletal muscle cells from embryonic and induced pluripotent stem cells as an in vitro model and for therapy of muscular dystrophies," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 16, no. 7, pp. 1353–1364, 2012.
- [241] C. Porta, R. Caporali, O. Epis, I. Ramaioli, R. Invernizzi, B. Rovati, G. Comolli, M. Danova, and C. Montecucco, "Impaired bone marrow hematopoietic progenitor cell function in rheumatoid arthritis patients candidate to autologous hematopoietic stem cell transplantation.," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 33, no. 7, pp. 721–8, 2004.
- [242] I. Colmegna, S. Pryshchep, H. Oishi, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand, "Dampened ERK signaling in hematopoietic progenitor cells in rheumatoid

- arthritis.," *Clin. Immunol.*, vol. 143, no. 1, pp. 73–82, 2012.
- [243] E. Kozhemyakina, M. Zhang, A. Ionescu, U. M. Ayturk, N. Ono, A. Kobayashi, H. Kronenberg, M. L. Warman, and A. B. Lassar, "Identification of a Prg4-expressing articular cartilage progenitor cell population in mice," *Arthritis Rheumatol.*, vol. 67, no. 5, pp. 1261–1273, 2015.
- [244] T. A. Rando and H. Y. Chang, "Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock.," *Cell*, vol. 148, no. 1–2, pp. 46–57, 2012.
- [245] M. Laplante and D. M. Sabatini, "mTOR signaling in growth control and disease," *Cell*, vol. 149, no. 2, pp. 274–293, 2012.
- [246] A. Salminen, J. Ojala, K. Kaarniranta, and A. Kauppinen, "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress activate inflammasomes: Impact on the aging process and age-related diseases," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 69, no. 18, pp. 2999–3013, 2012.
- [247] S. Mariathasan, K. Newton, D. M. Monack, D. Vucic, D. M. French, W. P. Lee, M. Roose-Girma, S. Erickson, and V. M. Dixit, "Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf," *Nature*, vol. 430, no. 6996, pp. 213–218, 2004.
- [248] J. P. de Magalhães, J. Curado, and G. M. Church, "Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 7, pp. 875–881, 2009.
- [249] A. S. Adler, T. L. Kawahara, E. Segal, and H. Y. Chang, "Reversal of aging by NF-kappaB blockade," *Cell Cycle*, vol. 7, no. 5, pp. 556–559, 2008.
- [250] F. G. Osorio, C. Bercena, C. Soria-Valles, A. J. Ramsay, F. de Carlos, J. Cobo, A. Fueyo, J. M. P. Freije, and C. Lopez-Otin, "Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-kappaB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response," *Genes Dev.*, vol. 26, no. 20, pp. 2311–2324, 2012.
- [251] J. S. Tilstra, A. R. Robinson, J. Wang, S. Q. Gregg, C. L. Clauson, D. P. Reay, L. A. Nasto, C. M. St Croix, A. Usas, N. Vo, J. Huard, P. R. Clemens, D. B. Stolz, D. C. Guttridge, S. C. Watkins, G. A. Garinis, Y. Wang, L. J. Niedernhofer, and P. D. Robbins, "NF-kappaB inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice," *J Clin Invest*, vol. 122, no. 7, pp. 2601–2612, 2012.
- [252] S. G. Deeks, "HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging.," *Annu. Rev. Med.*, vol. 62, pp. 141–55, 2011.
- [253] D. Aw, A. B. Silva, and D. B. Palmer, "Immunosenescence: Emerging challenges for an ageing population," *Immunology*, vol. 120, no. 4, pp. 435–446, 2007.
- [254] S. Agarwal and P. J. Busse, "Innate and adaptive immunosenescence," *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, vol. 104, no. 3, pp. 183–190, 2010.
- [255] G. Nelson, J. Wordsworth, C. Wang, D. Jurk, C. Lawless, C. Martin-Ruiz, and T. von Zglinicki, "A senescent cell bystander effect: Senescence-induced senescence," *Aging Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 345–349, 2012.

- [256] J. S. Lefebvre, A. C. Maue, S. M. Eaton, P. A. Lanthier, M. Tighe, and L. Haynes, "The aged microenvironment contributes to the age-related functional defects of CD4 T cells in mice," *Aging Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 732–740, 2012.
- [257] J. Park, H. M. Choi, H.-I. Yang, M. C. Yoo, and K. S. Kim, "Increased expression of IL-1 receptors in response to IL-1beta may produce more IL-6, IL-8, VEGF, and PGE(2) in senescent synovial cells induced in vitro than in presenescent cells.," *Rheumatol. Int.*, vol. 32, no. 7, pp. 2005–2010, Jul. 2012.
- [258] G. Barja, "Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 19, no. 12, pp. 1420–45, 2013.
- [259] J. Miquel, "Integración de teorías del envejecimiento (parte I)," *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.*, vol. 41, no. 1, pp. 55–63, 2006.
- [260] P. Ljubuncic and A. Z. Reznick, "The evolutionary theories of aging revisited - A mini-review," *Gerontology*, vol. 55, no. 2, pp. 205–216, 2009.
- [261] K. a Hughes and R. M. Reynolds, "Evolutionary and mechanistic theories of aging.," *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 50, pp. 421–445, 2005.
- [262] H. Y. Chung, H. J. Kim, J. W. Kim, and B. P. Yu, "The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 928, no. 3, pp. 327–335, 2001.
- [263] G. Vitale, M. Cesari, and D. Mari, "Aging of the endocrine system and its potential impact on sarcopenia.," *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 35, pp. 10–15, Nov. 2016.
- [264] K. Jin, "Modern Biological Theories of Aging.," *Aging Dis.*, vol. 1, no. 2, pp. 72–74, 2010.
- [265] A. Courties and J. Sellam, "Osteoarthritis and type 2 diabetes mellitus: What are the links?," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 122, pp. 198–206, Nov. 2016.
- [266] M. Harbo, J. M. Delaisse, P. Kjaersgaard-Andersen, F. B. Soerensen, S. Koelvraa, and L. Bendix, "The relationship between ultra-short telomeres, aging of articular cartilage and the development of human hip osteoarthritis.," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 134, no. 9, pp. 367–372, Sep. 2013.
- [267] D. J. Colacurcio and R. A. Nixon, "Disorders of lysosomal acidification-The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease," *Ageing Research Reviews*, 2016.
- [268] K.-H. Wagner, D. Cameron-Smith, B. Wessner, and B. Franzke, "Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology," *Nutrients*, vol. 8, no. 6, p. 338, 2016.
- [269] A. A. Cohen, E. Milot, Q. Li, P. Bergeron, R. Poirier, F. Dusseault-Bélangier, T. Fülöp, M. Leroux, V. Legault, E. J. Metter, L. P. Fried, and L. Ferrucci, "Detection of a novel, integrative aging process suggests complex physiological integration," *PLoS One*, vol. 10, no. 3, 2015.
- [270] Y. Arai, C. M. Martin-Ruiz, M. Takayama, Y. Abe, T. Takebayashi, S. Koyasu, M.

- Suematsu, N. Hirose, and T. von Zglinicki, "Inflammation, But Not Telomere Length, Predicts Successful Ageing at Extreme Old Age: A Longitudinal Study of Semi-supercentenarians," *EBioMedicine*, vol. 2, no. 10, pp. 1549–1558, 2015.
- [271] A. Burkle, M. Moreno-Villanueva, J. Bernhard, M. Blasco, G. Zondag, J. H. J. Hoeijmakers, O. Toussaint, B. Grubeck-Loebenstein, E. Mocchegiani, S. Collino, E. S. Gonos, E. Sikora, D. Gradinaru, M. Dolle, M. Salmon, P. Kristensen, H. R. Griffiths, C. Libert, T. Grune, N. Breusing, A. Simm, C. Franceschi, M. Capri, D. Talbot, P. Caiafa, B. Friguet, P. E. Slagboom, A. Hervonen, M. Hurme, and R. Aspinall, "MARK-AGE biomarkers of ageing," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 151, pp. 2–12, 2015.
- [272] D. W. Belsky, A. Caspi, R. Houts, H. J. Cohen, D. L. Corcoran, A. Danese, H. Harrington, S. Israel, M. E. Levine, J. D. Schaefer, K. Sugden, B. Williams, A. I. Yashin, R. Poulton, and T. E. Moffitt, "Quantification of biological aging in young adults," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 112, no. 30, pp. E4104–E4110, 2015.
- [273] W. G. Zhang, S. Y. Zhu, X. J. Bai, D. L. Zhao, S. M. Jiang, J. Li, Z. X. Li, B. Fu, G. Y. Cai, X. F. Sun, and X. M. Chen, "Select aging biomarkers based on telomere length and chronological age to build a biological age equation," *Age (Omaha)*, vol. 36, no. 3, pp. 1201–1211, 2014.
- [274] T. E. Johnson, "Recent results: Biomarkers of aging," *Experimental Gerontology*, vol. 41, no. 12, pp. 1243–1246, 2006.
- [275] C. J. Bulpitt, "Assessing Biological Age: Practicality?," *Gerontology*, vol. 41, pp. 315–321, 1995.
- [276] L. Bendix, M. Thinggaard, M. Fenger, S. Kolvraa, K. Avlund, A. Linneberg, and M. Osler, "Longitudinal changes in leukocyte telomere length and mortality in humans," *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 69 A, no. 2, pp. 231–239, 2014.
- [277] T. Steenstrup, J. V. B. Hjelmberg, L. H. Mortensen, M. Kimura, K. Christensen, and A. Aviv, "Leukocyte telomere dynamics in the elderly," *Eur. J. Epidemiol.*, vol. 28, no. 2, pp. 181–187, 2013.
- [278] S. Simonetti, X. Chen, S. Dimauro, and E. A. Schon, "Accumulation of Deletions in Human Mitochondrial DNA During Normal Aging - Analysis by Quantitative PCR," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1180, no. 2, pp. 113–122, 1992.
- [279] G. A. Cortopassi, D. Shibata, N. W. Soong, and N. Arnheim, "A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 16, pp. 7370–4, 1992.
- [280] C. Meissner and S. Ritz-Timme, "Molecular pathology and age estimation," *Forensic Sci. Int.*, vol. 203, no. 1–3, pp. 34–43, 2010.
- [281] N. S. Hamblet and F. J. Castora, "Mitochondrial DNA deletion analysis: a comparison of PCR quantitative methods," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 207, no. 2, pp. 839–847, 1995.
- [282] C. Zhang, L. E. Peters, A. W. Linnane, and P. Nagley, "'Comparison of quantitative PCR procedures for common mito deletion' Comparison of

- different quantitative PCR procedures in the analysis of the 4977-bp deletion in human mitochondrial DNA," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 223, no. 2, pp. 450–455, 1996.
- [283] C. Meissner, P. Bruse, S. A. Mohamed, A. Schulz, H. Warnk, T. Storm, and M. Oehmichen, "The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: A useful biomarker or more?," *Exp. Gerontol.*, vol. 43, no. 7, pp. 645–652, 2008.
- [284] S. C. Zapico and D. H. Ubelaker, "mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences.," *Aging Dis.*, vol. 4, no. 6, pp. 364–80, 2013.
- [285] L. Kalichman, I. Malkin, and E. Kobylansky, "Osseographic Score as a Biomarker of Biological Aging," vol. 5, 2008.
- [286] S. C. Zapico and D. H. Ubelaker, "Applications of physiological bases of ageing to forensic sciences. Estimation of age-at-death," *Ageing Research Reviews*, vol. 12, no. 2, pp. 605–617, 2013.
- [287] M. J. C. E. R. Waite S. Ritz-Timme, H-W. Schutz, C. Cattaneo and H. I. M. Borrman, "A review of the methodological aspects of aspartic acid racemization analysis for use in forensic science," *Forensic Sci. Int.*, vol. 103, no. 2, pp. 113–124, 1999.
- [288] J. B. Catterall, D. Barr, M. Bolognesi, R. D. Zura, and V. B. Kraus, "Post-translational aging of proteins in osteoarthritic cartilage and synovial fluid as measured by isomerized aspartate.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 11, no. 2, p. R55, 2009.
- [289] J. B. Catterall, R. D. Zura, M. P. Bolognesi, and V. B. Kraus, "Aspartic acid racemization reveals a high turnover state in knee compared with hip osteoarthritic cartilage," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 24, no. 2, pp. 374–381, 2016.
- [290] D.-H. Yang, T.-I. Chiang, I.-C. Chang, F.-H. Lin, C.-C. Wei, and Y.-W. Cheng, "Increased levels of circulating advanced glycation end-products in menopausal women with osteoporosis.," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 11, no. 5, pp. 453–60, 2014.
- [291] N. Verzijl, J. DeGroot, S. R. Thorpe, R. A. Bank, J. N. Shaw, T. J. Lyons, J. W. J. Bijlsma, F. P. J. G. Lafeber, J. W. Baynes, and J. M. TeKoppele, "Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 50, pp. 39027–39031, 2000.
- [292] L. Senolt, M. Braun, M. Olejárová, S. Forejtová, J. Gatterová, and K. Pavelka, "Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in serum and synovial fluid from patients with knee osteoarthritis and its relation with cartilage oligomeric matrix protein.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 64, no. 6, pp. 886–90, 2005.
- [293] A. C. Chen, M. M. Temple, D. M. Ng, N. Verzijl, J. Degroot, J. M. Tekoppele, and R. L. Sah, "Induction of advanced glycation end products and alterations of the tensile properties of articular cartilage," *Arthritis Rheum.*, vol. 46, no. 12, pp. 3212–3217, 2002.
- [294] R. Vytásek, L. Sedová, V. Vilím, R. Vytášek, S. V. Vladimír, R. Vytásek, L. Sedová,

- and V. Vilím, "Increased concentration of two different advanced glycation end-products detected by enzyme immunoassays with new monoclonal antibodies in sera of patients with rheumatoid arthritis," *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 11, no. 1, p. 83, 2010.
- [295] J. M. Tanner, R. H. Whitehouse, W. A. Marshall, and B. S. Carter, "Prediction of adult height from height, bone age, and occurrence of menarche, at ages 4 to 16 with allowance for midparent height.," *Arch. Dis. Child.*, vol. 50, no. 1, pp. 14–26, 1975.
- [296] G. . L. and O. . P. E. . Kobyliansky, "Population Biology of Human Aging : Methods of Assessment and Sex Variation," *Wayne State Univ. Press*, vol. 67, no. 1, pp. 87–109, 2016.
- [297] D. Karasik, M. T. Hannan, L. A. Cupples, D. T. Felson, and D. P. Kiel, "Genetic contribution to biological aging: the Framingham Study.," *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 59, no. 3, pp. 218–26, 2004.
- [298] K.-W. Lin and J. Yan, "The telomere length dynamic and methods of its assessment.," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 9, no. 4, pp. 977–989, 2005.
- [299] L. Bendix, P. B. Horn, U. B. Jensen, I. Rubelj, and S. Kolvraa, "The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells," *Aging Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 383–397, 2010.
- [300] R. M. Cawthon, "Telomere measurement by quantitative PCR.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 10, p. e47, 2002.
- [301] A. Aviv, S. C. Hunt, J. Lin, X. Cao, M. Kimura, and E. Blackburn, "Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 20, pp. 1–5, 2011.
- [302] R. M. Cawthon, "Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 3, 2009.
- [303] N. J. O'Callaghan and M. Fenech, "A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length.," *Biol. Proced. Online*, vol. 13, no. 1, p. 3, 2011.
- [304] C. Bischoff, H. C. Petersen, J. Graakjaer, K. Andersen-Ranberg, J. W. Vaupel, V. A. Bohr, S. Kølvråa, K. Christensen, K. Andersen-Ranberg, J. W. Vaupel, V. A. Bohr, S. Kolvraa, and K. Christensen, "No association between telomere length and survival among the elderly and oldest old," *Epidemiology*, vol. 17, no. 2, pp. 190–194, 2006.
- [305] C. M. Martin-Ruiz, J. Gussekloo, H. D. van, Z. T. von, and R. G. Westendorp, "Telomere length in white blood cells is not associated with morbidity or mortality in the oldest old: a population-based study," *Aging Cell*, vol. 4, no. 1474–9718 (Print), pp. 287–290, 2005.
- [306] A. Muezzinler, A. K. Zaineddin, and H. Brenner, "A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults.," *Ageing Res. Rev.*, vol. 12, no. 2, pp. 509–519, Mar. 2013.

- [307] S. Bocklandt, W. Lin, M. E. Sehl, F. J. Sánchez, J. S. Sinsheimer, S. Horvath, and E. Vilain, "Epigenetic predictor of age," *PLoS One*, vol. 6, no. 6, 2011.
- [308] M. J. Jones, S. J. Goodman, and M. S. Kobor, "DNA methylation and healthy human aging," *Aging Cell*, pp. 924–932, 2015.
- [309] C. I. Weidner, Q. Lin, C. M. Koch, L. Eisele, F. Beier, P. Ziegler, D. O. Bauerschlag, K.-H. Jöckel, R. Erbel, T. W. Mühleisen, M. Zenke, T. H. Brummendorf, and W. Wagner, "Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites.," *Genome Biol.*, vol. 15, no. 2, p. R24, 2014.
- [310] S. H. Yi, Y. S. Jia, K. Mei, R. Z. Yang, and D. X. Huang, "Age-related DNA methylation changes for forensic age-prediction," *Int. J. Legal Med.*, vol. 129, no. 2, pp. 237–244, 2015.
- [311] R. Zbieć-Piekarska, M. Spólnicka, T. Kupiec, A. Parys-Proszek, Ż. Makowska, A. Pałeczka, K. Kucharczyk, R. Płoski, and W. Branicki, "Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis.," *Forensic Sci. Int. Genet.*, vol. 17, pp. 173–9, 2015.
- [312] B. Bekaert, A. Kamalandua, S. C. Zapico, W. Van De Voorde, and R. Decorte, "Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers," *Epigenetics*, vol. 10, no. 10, pp. 922–930, 2015.
- [313] Y. Huang, J. Yan, J. Hou, X. Fu, L. Li, and Y. Hou, "Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain," *Forensic Sci. Int. Genet.*, vol. 17, pp. 129–136, 2015.
- [314] D. S. B. S. Silva, J. Antunes, K. Balamurugan, G. Duncan, C. S. Alho, and B. Mccord, "Evaluation of DNA methylation markers and their potential to predict human aging," *Electrophoresis*, vol. 36, no. 15, pp. 1775–1780, 2015.
- [315] A. Freire-Aradas, C. Phillips, A. Mosquera-Miguel, L. Gir??n-Santamar??a, A. G??mez-Tato, M. Casares De Cal, J. ??lvarez-Dios, J. Ansedo-Bermejo, M. Torres-Espa??ol, P. M. Schneider, E. Po??piech, W. Branicki, Carracedo, and M. V. Lareu, "Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system," *Forensic Sci. Int. Genet.*, vol. 24, pp. 65–74, 2016.
- [316] M. Matjusaitis, G. Chin, E. A. Sarnoski, and A. Stolzing, "Biomarkers to identify and isolate senescent cells," *Ageing Res. Rev.*, vol. 29, pp. 1–12, 2016.
- [317] G. P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, and P.-S. O, "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo," *Proc Natl Acad Sci*, vol. 92, no. 20, pp. 9363–9367, 1995.
- [318] K. Itahana, Y. Itahana, and G. P. Dimri, "Colorimetric Detection of Senescence-Associated B Galactosidase," vol. 965, no. 17, pp. 197–213, 2013.
- [319] A. M. Thompson, R. Wagner, and E. M. Rzucidlo, "Age-related loss of SirT1 expression results in dysregulated human vascular smooth muscle cell function.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 307, no. 4, pp. H533-41, 2014.

- [320] K. Itahana, J. Campisi, and G. P. Dimri, "Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay," *Methods Mol. Biol.*, vol. 371, no. 1, pp. 21–31, 2007.
- [321] L. Carmona, R. Gabriel, J. Ballina, A. Laffon, and Grupo de Estudio EPISER, "Proyecto EPISER 2000: prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española," *Rev. Española Reumatol.*, vol. 28, no. 1, pp. 18–25, 2001.
- [322] E. Loza, J. M. Lopez-Gomez, L. Abasolo, J. Maese, L. Carmona, and E. Batlle-Gualda, "Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain," *Arthritis Rheum.*, vol. 61, no. 2, pp. 158–65, 2009.
- [323] R. F. Loeser, "Aging and osteoarthritis," *Curr Opin Rheumatol.*, vol. 23, no. 5, pp. 492–496, 2011.
- [324] G. Herrero-Beaumont, J. a. Roman-Blas, S. Castañeda, and S. a. Jimenez, "Primary Osteoarthritis No Longer Primary: Three Subsets with Distinct Etiological, Clinical, and Therapeutic Characteristics," *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 39, no. 2, pp. 71–80, 2009.
- [325] R. F. Loeser, "Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis," *Clin. Geriatr. Med.*, vol. 26, no. 3, pp. 371–386, Aug. 2010.
- [326] M. Quintero, D. R. Mitrovic, A. Stankovic, S. de Seze, L. Miravet, and A. Ryckewaert, "[Cellular aspects of the aging of articular cartilage. I. Condylar cartilage with a normal surface sampled from normal knees]," *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.*, vol. 51, no. 7–8, pp. 375–379, 1984.
- [327] J. A. Martin, S. M. Ellerbroek, and J. A. Buckwalter, "Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins," *J. Orthop. Res.*, vol. 15, no. 4, pp. 491–8, 1997.
- [328] H. Mitsuyama, R. M. Healey, R. A. Terkeltaub, R. D. Coutts, and D. Amiel, "Calcification of human articular knee cartilage is primarily an effect of aging rather than osteoarthritis," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 15, no. 5, pp. 559–565, 2007.
- [329] N. Schneider, A. Mouithys-Mickalad, J. P. Lejeune, C. Duyckaerts, F. Sluse, G. Deby-Dupont, and D. Serteyn, "Oxygen consumption of equine articular chondrocytes: Influence of applied oxygen tension and glucose concentration during culture," *Cell Biol. Int.*, vol. 31, no. 9, pp. 878–886, 2007.
- [330] K. Yamada, R. Healey, D. Amiel, M. Lotz, and R. Coutts, "Subchondral bone of the human knee joint in aging and osteoarthritis," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 10, no. 5, pp. 360–369, 2002.
- [331] I. Rego, M. Fernández-Moreno, C. Fernández-López, J. J. Gómez-Reino, A. González, J. Arenas, and F. J. Blanco, "Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 69, no. 1, pp. 210–3, 2010.
- [332] I. Rego-Pérez, M. Fernández-Moreno, M. Deberg, S. Pérttega, C. Fenández-López, N. Oreiro, Y. Henrotin, and F. J. Blanco, "Mitochondrial DNA haplogroups

- modulate the serum levels of biomarkers in patients with osteoarthritis.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 69, no. 5, pp. 910–7, 2010.
- [333] R. A. Bank, M. T. Bayliss, F. P. J. G. Lafeber, A. Maroudas, and J. M. Tekoppele, "Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage. The age-related increase in non-enzymatic glycation affects biomechanical properties of cartilage.," *Biochem. J.*, vol. 330, no. Pt 1, pp. 345–351, 1998.
- [334] C. G. Armstrong and V. C. Mow, "Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 64, no. 1, pp. 88–94, 1982.
- [335] E. Vignon, M. Arlot, and G. Vignon, "The cellularity of fibrillated articular cartilage. A comparative study of age-related and osteoarthrotic cartilage lesions from the human femoral head," *Pathol Biol*, vol. 25, no. 1, pp. 29–32, 1977.
- [336] M. K. Lotz, S. Otsuki, S. P. Grogan, R. Sah, R. Terkeltaub, and D. D'Lima, "Cartilage cell clusters," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 62, no. 8. pp. 2206–2218, 2010.
- [337] J. a Martin and J. a Buckwalter, "Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis.," *Iowa Orthop. J.*, vol. 21, no. 319, pp. 1–7, 2001.
- [338] J. A. Martin and J. A. Buckwalter, "Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes.," *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 56, no. 4, pp. B172-9, 2001.
- [339] M. M. Rahman, J. A. Kopec, A. H. Anis, J. Cibere, and C. H. Goldsmith, "Risk of cardiovascular disease in patients with osteoarthritis: a prospective longitudinal study.," *Arthritis Care Res. (Hoboken).*, vol. 65, no. 12, pp. 1951–8, 2013.
- [340] K. Louati, C. Vidal, F. Berenbaum, and J. Sellam, "Association between diabetes mellitus and osteoarthritis: systematic literature review and meta-analysis.," *RMD open*, vol. 1, no. 1, p. e000077, 2015.
- [341] M. V. Castell, S. van der Pas, A. Otero, P. Siviero, E. Dennison, M. Denkinger, N. Pedersen, M. Sanchez-Martinez, R. Queipo, N. van Schoor, S. Zambon, M. Edwards, R. Peter, L. Schaap, and D. Deeg, "Osteoarthritis and frailty in elderly individuals across six European countries: results from the European Project on OsteoArthritis (EPOSA).," *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 16, no. 1, p. 359, 2015.
- [342] E. Nüesch, P. Dieppe, S. Reichenbach, S. Williams, S. Iff, and P. Jüni, "All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study.," *BMJ*, vol. 342, no. mar08\_2, p. d1165, 2011.
- [343] R. R. Monson and A. P. Hall, "Mortality among arthritics," *J. Chronic Dis.*, vol. 29, no. 7, pp. 459–467, 1976.
- [344] J. T. H. Nielen, P. J. Emans, P. C. Dagnelie, A. Boonen, A. Lalmohamed, A. De Boer, B. J. F. Van Den Bemt, and F. De Vries, "Severity of Diabetes Mellitus and

- Total Hip or Knee Replacement," *Med. (United States)*, vol. 95, no. 20, 2016.
- [345] J. Vaculik, M. Braun, P. Dungal, K. Pavelka, and J. J. Stepan, "Serum and bone pentosidine in patients with low impact hip fractures and in patients with advanced osteoarthritis," *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 17, p. 308, Jul. 2016.
- [346] R. F. Loeser, "Aging and osteoarthritis," *Curr Opin Rheumatol.*, vol. 23, no. 5, pp. 492–496, 2011.
- [347] E. van der Spoel, M. P. Rozing, J. J. Houwing-Duistermaat, P. Eline Slagboom, M. Beekman, A. J. M. de Craen, R. G. J. Westendorp, and D. van Heemst, "Manual SER de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas," *Aging (Albany. NY)*, vol. 7, no. 11, pp. 956–963, 2015.
- [348] D. L. Scott, F. Wolfe, and T. W. J. Huizinga, "Rheumatoid arthritis," *Lancet*, vol. 376, no. 9746, pp. 1094–108, 2010.
- [349] C. S. Crowson, E. L. Matteson, E. Myasoedova, C. J. Michet, F. C. Ernste, K. J. Warrington, M. John, D. Iij, G. G. Hunder, T. M. Therneau, and S. E. Gabriel, "The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases," *Arthritis Rheum.*, vol. 63, no. 3, pp. 633–639, 2011.
- [350] A. Larbi, T. F??l??p, and G. Pawelec, "Immune receptor signaling, aging and autoimmunity," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 640. pp. 312–324, 2008.
- [351] R. A. Moura, P. Weinmann, P. A. Pereira, J. Caetano-Lopes, H. Canhão, E. Sousa, A. F. Mourão, A. M. Rodrigues, M. V. Queiroz, M. M. Souto-Carneiro, L. Graça, and J. E. Fonseca, "Alterations on peripheral blood B-cell subpopulations in very early arthritis patients," *Rheumatology*, vol. 49, no. 6, pp. 1082–1092, 2010.
- [352] K. S. M. van der Geest, W. H. Abdulahad, P. Chalan, A. Rutgers, G. Horst, M. G. Huitema, M. P. Roffel, C. Roozendaal, P. M. Kluin, N. a Bos, A. M. H. Boots, and E. Brouwer, "Disturbed B cell homeostasis in newly diagnosed giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 66, no. 7, pp. 1927–38, 2014.
- [353] N. a Duggal, J. Upton, A. C. Phillips, E. Sapey, and J. M. Lord, "An age-related numerical and functional deficit in CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) B cells is associated with an increase in systemic autoimmunity," *Aging Cell*, vol. 12, no. 5, pp. 873–81, 2013.
- [354] L. Ziegler-Heitbrock, "The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 81, no. 3, pp. 584–92, 2007.
- [355] N. Kawanaka, M. Yamamura, T. Aita, Y. Morita, A. Okamoto, M. Kawashima, M. Iwahashi, A. Ueno, Y. Ohmoto, and H. Makino, "CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 46, no. 10, pp. 2578–2586, 2002.
- [356] M. Krasselt, C. Baerwald, U. Wagner, and M. Rossol, "CD56+ monocytes have a dysregulated cytokine response to lipopolysaccharide and accumulate in rheumatoid arthritis and immunosenescence," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 15, no.

- 5, p. R139, 2013.
- [357] T. Namekawa, M. R. Snyder, J. H. Yen, B. E. Goehring, P. J. Leibson, C. M. Weyand, and J. J. Goronzy, "Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis.," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 2, pp. 1138–1145, 2000.
- [358] M. Fann, W. K. Chiu, W. H. Wood, B. L. Levine, K. G. Becker, and N. P. Weng, "Gene expression characteristics of CD28null memory phenotype CD8+ T cells and its implication in T-cell aging," *Immunol. Rev.*, vol. 205, pp. 190–206, 2005.
- [359] K. J. Warrington, S. Takemura, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand, "CD4+,CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems," *Arthritis Rheum*, vol. 44, no. 1, pp. 13–20, 2001.
- [360] A. E. R. Fasth, O. Snir, A. a T. Johansson, B. Nordmark, A. Rahbar, E. Af Klint, N. K. Björkström, A.-K. Ulfgrén, R. F. van Vollenhoven, V. Malmström, and C. Trollmo, "Skewed distribution of proinflammatory CD4+CD28null T cells in rheumatoid arthritis.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 9, no. 5, p. R87, 2007.
- [361] M. C. de Andres, E. Perez-Pampin, M. Calaza, F. J. Santaclara, I. Ortea, J. J. Gomez-Reino, and A. Gonzalez, "Assessment of global DNA methylation in peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 17, no. 1, p. 233, 2015.
- [362] A. M. Grabiec and K. a Reedquist, "Histone deacetylases in RA: epigenetics and epiphenomena.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 12, no. 5, p. 142, 2010.
- [363] L. C. Huber, M. Brock, H. Hemmatazad, O. T. Giger, F. Moritz, M. Trenkmann, J. H. W. Distler, R. E. Gay, C. Kolling, H. Moch, B. A. Michel, S. Gay, O. Distler, and A. J?ngel, "Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients," *Arthritis Rheum.*, vol. 56, no. 4, pp. 1087–1093, 2007.
- [364] D. Wendling, W. Abbas, M. Godfrin-Valnet, A. Kumar, X. Guillot, K. A. Khan, C. Vidon, L. Coquard, E. Toussiro, C. Prati, and G. Herbein, "Dysregulated serum IL-23 and SIRT1 activity in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis," *PLoS One*, vol. 10, no. 3, 2015.
- [365] M. Scarsi, T. Ziglioli, and P. Airo, "Decreased circulating CD28-negative T cells in patients with rheumatoid arthritis treated with abatacept are correlated with clinical response," *J. Rheumatol.*, vol. 37, no. 5, pp. 911–916, 2010.
- [366] E. Bryl, A. N. Vallejo, E. L. Matteson, J. M. Witkowski, C. M. Weyand, and J. J. Goronzy, "Modulation of CD28 expression with anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis.," *Arthritis Rheum.*, vol. 52, no. 10, pp. 2996–3003, 2005.
- [367] M.-C. Kastrinaki, P. Sidiropoulos, S. Roche, J. Ringe, S. Lehmann, H. Kritikos, V.-M. Vlahava, B. Delorme, G. D. Eliopoulos, C. Jorgensen, P. Charbord, T. Häupl, D. T. Boumpas, and H. a Papadaki, "Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 67, no. 6, pp. 741–9, 2008.

- [368] S. E. Steer, F. M. K. Williams, B. Kato, J. P. Gardner, P. J. Norman, M. a Hall, M. Kimura, R. Vaughan, A. Aviv, and T. D. Spector, "Reduced telomere length in rheumatoid arthritis is independent of disease activity and duration.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 66, no. 4, pp. 476–80, 2007.
- [369] K. H. Costenbader, J. Prescott, R. Y. Zee, and I. De vivo, "Immunosenescence and Rheumatoid Arthritis: Does Telomere Shortening Predict Impeding Disease?," *Autoimmun. Rev.*, vol. 10, no. 9, pp. 569–573, 2011.
- [370] M. Salmon and A. N. Akbar, "Telomere erosion: A new link between HLA DR4 and rheumatoid arthritis?," *Trends in Immunology*, vol. 25, no. 7. pp. 339–341, 2004.
- [371] T. Miyata, N. Ishiguro, Y. Yasuda, T. Ito, M. Nangaku, H. Iwata, and K. Kurokawa, "Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 244, no. 1, pp. 45–49, 1998.
- [372] S. Kato, K. Itoh, M. Ochiai, A. Iwai, Y. Park, S. Hata, K. Takeuchi, M. Ito, J. Imaki, S. Miura, K. Yakabi, and M. Kobayashi, "Increased pentosidine, an advanced glycation end-product, in urine and tissue reflects disease activity in inflammatory bowel diseases," in *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 2008, vol. 23, no. SUPPL. 2.
- [373] L. Senolt, M. Braun, J. Vencovský, L. Sedová, and K. Pavelka, "Advanced glycation end-product pentosidine is not a relevant marker of disease activity in patients with rheumatoid arthritis.," *Physiol. Res.*, vol. 56, no. 6, pp. 771–7, 2007.
- [374] Y. Kageyama, M. Takahashi, T. Nagafusa, E. Torikai, and A. Nagano, "Methotrexate reduces the levels of pentosidine and 8-hydroxy-deoxy guanosine in patients with rheumatoid arthritis," *Mod. Rheumatol.*, vol. 17, no. 5, pp. 398–402, 2007.
- [375] Y. Kageyama, M. Takahashi, T. Ichikawa, E. Torikai, and A. Nagano, "Reduction of oxidative stress marker levels by anti-TNF-?? antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis," *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 26, no. 1, pp. 73–80, 2008.
- [376] Y. Liu, M. J. Aryee, L. Padyukov, M. D. Fallin, A. Runarsson, L. Reinius, N. Acevedo, M. Taub, M. Ronninger, K. Shchetynsky, A. Scheynius, and J. Kere, "Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in Rheumatoid Arthritis," *Nat Biotechnol*, vol. 31, no. 2, pp. 142–147, 2013.
- [377] L. Padyukov, C. Suva, P. Stolt, L. Alfredsson, and L. Klareskog, "A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 50, no. 10, pp. 3085–3092, 2004.
- [378] P. Stolt, C. Bengtsson, B. Nordmark, S. Lindblad, I. Lundberg, L. Klareskog, and L. Alfredsson, "Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident

- cases.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 62, no. 9, pp. 835–41, 2003.
- [379] L. Klareskog, P. Stolt, K. Lundberg, H. K??llberg, C. Bengtsson, J. Grunewald, J. R??nnelid, H. E. Harris, A. K. Ulfgren, S. Rantap??-Dahlqvist, A. Eklund, L. Padyukov, and L. Alfredsson, "A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination," *Arthritis Rheum.*, vol. 54, no. 1, pp. 38–46, 2006.
- [380] L. L. Lam, E. Emberly, H. B. Fraser, S. M. Neumann, E. Chen, G. E. Miller, and M. S. Kobor, "Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. Supplement\_2, pp. 17253–17260, 2012.
- [381] J. Rodriguez-Lopez, M. Pombo-Suarez, M. Liz, J. J. Gomez-Reino, and A. Gonzalez, "Lack of association of a variable number of aspartic acid residues in the asporin gene with osteoarthritis susceptibility: case-control studies in Spanish Caucasians.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 8, no. 3, p. R55, 2006.
- [382] R. Altman, G. Alarcón, D. Appelrouth, D. Bloch, D. Borenstein, K. Brandt, C. Brown, T. D. Cooke, W. Daniel, and R. Gray, "The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand.," *Arthritis Rheum.*, vol. 33, no. 11, pp. 1601–1610, 1990.
- [383] J. Delgado-Calle, A. F. Fernandez, J. Sainz, M. T. Zarrabeitia, C. Sañudo, R. Garcia-Renedo, M. I. Perez-Nuñez, C. Garcia-Ibarbia, M. F. Fraga, and J. A. Riancho, "Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 65, no. 1, pp. 197–205, 2013.
- [384] J. Fernández-Tajes, A. Soto-Hermida, M. E. Vázquez-Mosquera, E. Cortés-Pereira, A. Mosquera, M. Fernández-Moreno, N. Oreiro, C. Fernández-López, J. L. Fernández, I. Rego-Pérez, and F. J. Blanco, "Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 73, no. 4, pp. 668–77, 2014.
- [385] K. Lokk, V. Modhukur, B. Rajashekar, K. Märten, R. Mägi, R. Kolde, M. Kolt Ina, T. K. Nilsson, J. Vilo, A. Salumets, and N. Tõnisson, "DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns.," *Genome Biol.*, vol. 15, no. 4, p. R54, 2014.
- [386] E. Aref-Eshghi, Y. Zhang, M. Liu, P. E. Harper, G. Martin, A. Furey, R. Green, G. Sun, P. Rahman, and G. Zhai, "Genome-wide DNA methylation study of hip and knee cartilage reveals embryonic organ and skeletal system morphogenesis as major pathways involved in osteoarthritis.," *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 16, no. 1, p. 287, 2015.
- [387] F. C. Arnett, S. M. Edworthy, D. a Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. a Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, and H. S. Luthra, "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 31, no. 3. pp. 315–324, 1988.
- [388] R. Dieguez-Gonzalez, M. Calaza, E. Perez-Pampin, A. R. De La Serna, B.

- Fernandez-Gutierrez, S. Castañeda, R. Largo, B. Joven, J. Narvaez, F. Navarro, J. L. Marengo, J. L. Vicario, F. J. Blanco, J. C. Fernandez-Lopez, R. Caliz, M. D. Collado-Escobar, L. Carreño, J. Lopez-Longo, J. D. Cañete, J. J. Gomez-Reino, and A. Gonzalez, "Association of interferon regulatory factor 5 haplotypes, similar to that found in systemic lupus erythematosus, in a large subgroup of patients with rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 58, no. 5, pp. 1264–1274, 2008.
- [389] A. Montes, R. Dieguez-Gonzalez, E. Perez-Pampin, M. Calaza, A. Mera-Varela, J. J. Gomez-Reino, and A. Gonzalez, "Particular association of clinical and genetic features with autoimmunity to citrullinated  $\alpha$ -enolase in rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 63, no. 3, pp. 654–661, 2011.
- [390] T. Huizinga, P. Nigrovic, E. Ruderman, and H. Schulze-Koops, "A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis: Commentary," *Int. J. Adv. Rheumatol.*, vol. 9, no. 2, pp. 70–71, 2011.
- [391] L.-C. Li and R. Dahiya, "MethPrimer: designing primers for methylation PCRs," *Bioinformatics*, vol. 18, no. 11, pp. 1427–1431, 2002.
- [392] M. Zuker, "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 13, pp. 3406–3415, 2003.
- [393] A. Kaminsky, Zachary a. Petronis, "Methylation SNaPshot: A Method for the Quantification of Site-Specific DNA Methylation Levels," *Methods Mol. Biol.*, vol. 507, no. 2, pp. 241–255, 2009.
- [394] Z. a. Kaminsky, A. Assadzadeh, J. Flanagan, and A. Petronis, "Single nucleotide extension technology for quantitative site-specific evaluation of metC/C in GC-rich regions," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 10, pp. 1–12, 2005.
- [395] F. Faul, E. Erdfelder, A.-G. Lang, and A. Buchner, "G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences.," *Behav. Res. Methods*, vol. 39, no. 2, pp. 175–91, 2007.
- [396] E. A. Houseman, W. P. Accomando, D. C. Koestler, B. C. Christensen, C. J. Marsit, H. H. Nelson, J. K. Wiencke, and K. T. Kelsey, "DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution.," *BMC Bioinformatics*, vol. 13, no. 1, p. 86, 2012.
- [397] S. Horvath, V. Mah, A. T. Lu, J. S. Woo, O. W. Choi, A. J. Jasinska, a José, S. Tung, N. S. Coles, J. Braun, H. V Vinters, and L. Stephen, "The cerebellum ages slowly according to the epigenetic clock," vol. 7, no. 5, pp. 1–13, 2015.
- [398] A. E. Jaffe and R. a Irizarry, "Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies.," *Genome Biol.*, vol. 15, no. 2, p. R31, 2014.
- [399] L. Reynard, "The aging process and epigenetics: Relationship with OA," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 23, p. A18, Sep. 2016.
- [400] S. Horvath, P. Garagnani, M. Bacalini, C. Pirazzini, S. Salvioli, D. Gentilini, A. Di Blasio, C. Giuliani, S. Tung, H. Vinters, and C. Franceschi, "Accelerated epigenetic

- aging in Down syndrome," *Aging Cell*, pp. 1–5, 2015.
- [401] S. Horvath, W. Erhart, M. Brosch, O. Ammerpohl, W. von Schonfels, M. Ahrens, N. Heits, J. T. Bell, P.-C. Tsai, T. D. Spector, P. Deloukas, R. Siebert, B. Sipos, T. Becker, C. Rocken, C. Schafmayer, and J. Hampe, "Obesity accelerates epigenetic aging of human liver," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 43, pp. 15538–15543, 2014.
- [402] K. T. Sibille, T. Langaee, B. Burkley, Y. Gong, T. L. Glover, C. King, J. L. Riley, C. Leeuwenburgh, R. Staud, L. A. Bradley, and R. B. Filligim, "Chronic pain, perceived stress, and cellular aging: an exploratory study," *Mol. Pain*, vol. 8, no. 1, p. 12, 2012.
- [403] L. Daniali, A. Benetos, E. Susser, J. D. Kark, C. Labat, M. Kimura, K. Desai, M. Granick, and A. Aviv, "Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 1597, 2013.
- [404] T. Neogi and Y. Zhang, "Epidemiology of Osteoarthritis," *Rheumatic Disease Clinics of North America*, vol. 39, no. 1. pp. 1–19, 2013.
- [405] L. Vidal-Bralo, Y. Lopez-Golan, and A. Gonzalez, "Simplified Assay for Epigenetic Age Estimation in Whole Blood of Adults," *Front. Genet.*, vol. 7, no. July, pp. 1–7, 2016.
- [406] T. Aigner, J. Rose, J. Martin, and J. Buckwalter, "Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology," *Rejuvenation Res.*, vol. 7, no. 2, pp. 134–145, 2004.
- [407] L. T. H. Jacobsson, C. Turesson, J.-A. Nilsson, I. F. Petersson, E. Lindqvist, T. Saxne, and P. Geborek, "Treatment with TNF blockers and mortality risk in patients with rheumatoid arthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 66, no. 5, pp. 670–5, 2007.
- [408] a. Young, G. Koduri, M. Batley, E. Kulinskaya, a. Gough, S. Norton, and J. Dixey, "Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis," *Rheumatology*, vol. 46, no. 2, pp. 350–357, 2007.
- [409] S. Ajeganova, M. L. E. Andersson, J. Frostegård, and I. Hafström, "Disease factors in early rheumatoid arthritis are associated with differential risks for cardiovascular events and mortality depending on age at onset: A 10-year observational cohort study," *J. Rheumatol.*, vol. 40, no. 12, pp. 1958–1966, 2013.
- [410] R. E. Marioni, S. Shah, A. F. McRae, B. H. Chen, E. Colicino, S. E. Harris, J. Gibson, A. K. Henders, P. Redmond, S. R. Cox, A. Pattie, J. Corley, L. Murphy, N. G. Martin, G. W. Montgomery, A. P. Feinberg, M. D. Fallin, M. L. Multhaup, A. E. Jaffe, R. Joehanes, J. Schwartz, A. C. Just, K. L. Lunetta, J. M. Murabito, J. M. Starr, S. Horvath, A. a Baccarelli, D. Levy, P. M. Visscher, N. R. Wray, and I. J. Deary, "DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life," *Genome Biol.*, vol. 16, no. 1, p. 25, 2015.
- [411] L. Christiansen, A. Lenart, Q. Tan, J. W. Vaupel, A. Aviv, M. Mcgue, and K.

- Christensen, "DNA methylation age is associated with mortality in a longitudinal Danish twin study," *Aging Cell*, no. October 2015, pp. 149–154, 2015.
- [412] R. Testa, F. Olivieri, C. Sirolla, L. Spazzafumo, M. R. Rippo, M. Marra, a R. Bonfigli, a Ceriello, R. Antonicelli, C. Franceschi, C. Castellucci, I. Testa, and a D. Procopio, "Leukocyte telomere length is associated with complications of type 2 diabetes mellitus," *Diabet. Med.*, vol. 28, no. 11, pp. 1388–94, 2011.
- [413] J. Lin, J. A. Blalock, M. Chen, Y. Ye, J. Gu, L. Cohen, P. M. Cinciripini, and X. Wu, "Depressive symptoms and short telomere length are associated with increased mortality in bladder cancer patients," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 24, no. 2, pp. 336–343, 2015.
- [414] R. E. Marioni, S. E. Harris, S. Shah, A. F. Mcrae, T. Von Zglinicki, C. Martin-ruiz, N. R. Wray, P. M. Visscher, and I. J. Deary, "The epigenetic clock and telomere length are independently associated with chronological age and mortality," *Int. J. Epidemiol.*, pp. 1–9, 2016.
- [415] J. Svensson, M. K. Karlsson, O. Ljunggren, A. Tivesten, D. Mellström, and S. Movérare-Skrtic, "Leukocyte telomere length is not associated with mortality in older men.," *Exp. Gerontol.*, vol. 57C, pp. 6–12, 2014.
- [416] B. L. Needham, D. Rehkopf, N. Adler, S. Gregorich, J. Lin, E. H. Blackburn, and E. S. Epel, "Leukocyte telomere length and mortality in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002.," *Epidemiology*, vol. 26, no. 4, pp. 528–35, 2015.

## **ANEXOS**

- 1. Simplified assay for epigenetic age estimation in whole blood of adults**
- 2. Specific premature epigenetic aging of cartilage in osteoarthritis**







# Simplified Assay for Epigenetic Age Estimation in Whole Blood of Adults

Laura Vidal-Bralo, Yolanda Lopez-Golan and Antonio Gonzalez\*

Laboratorio de Investigacion 10 and Rheumatology Unit, Instituto de Investigacion Sanitaria – Hospital Clinico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Rui Henrique,  
Portuguese Institute of Oncology,  
Portugal

### Reviewed by:

Alex Zhavoronkov,  
The Biogerontology Research  
Foundation, UK  
Brian H. Chen,  
National Institute on Aging, USA

### \*Correspondence:

Antonio Gonzalez  
agmartinezp@ser.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Epigenomics and Epigenetics,  
a section of the journal  
Frontiers in Genetics

**Received:** 10 May 2016

**Accepted:** 04 July 2016

**Published:** 14 July 2016

### Citation:

Vidal-Bralo L, Lopez-Golan Y and  
Gonzalez A (2016) Simplified Assay  
for Epigenetic Age Estimation  
in Whole Blood of Adults.  
*Front. Genet.* 7:126.  
doi: 10.3389/fgene.2016.00126

Biological age is not always concordant with chronological age and the departures are of interest for understanding how diseases and environmental insults affect tissue function, organismal health, and life expectancy. The best-known biological age biomarker is telomere length, but there are more accurate biomarkers as the recently developed based in epigenetic, transcriptomic, or biochemical changes. The most accurate are the epigenetic biomarkers based on specific changes in DNA methylation referred as DNA methylation age measures (DmAM). Here, we have developed and validated a new DmAM that addresses some limitations of the previously available. The new DmAM includes the study in whole blood (WB) of 8 CpG sites selected as the most informative on a training set of 390 healthy subjects. The 8 CpG DmAM showed better accuracy than other DmAM based in few CpG in an independent validation set of 335 subjects. Results were not significantly influenced by sex, smoking, or variation in blood cell subpopulations. In addition, the new 8 CpG DmAM was amenable to study in a single multiplex reaction done with methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (MS-SNuPE), a methodology based on commercially available reagents and run in capillary electrophoresis sequencers. In this way, the high cost of DNA methylation microarrays or of a pyrosequencer, which are needed for alternative DmAM, was avoided. Performance of the DmAM with MS-SNuPE was assessed in a set of 557 donors, showing high call rate (>97%), low CV (<3.3%) and high accuracy (Mean Absolute Deviation = 6.07 years). Therefore, the 8 CpG DmAM is a feasible and accurate tool for assessing the epigenetic component of biological age in blood of adults.

**Keywords:** epigenetic, biological age, blood, DNA methylation, MS-SnuPE, biomarker

## INTRODUCTION

Biomarkers of biological age are very useful for identifying situations of premature aging (Lopez-Otin et al., 2013). The best-known biomarker of this type is telomere length, which is shortened during each cell division in cells lacking the telomerase enzyme (Oeseburg et al., 2010; Zhu et al., 2011). It has been found prematurely shortened in blood cells of patients with a variety of diseases and in relation with decreased life expectancy. The appeal of this technology is such that several companies have been created to offer predictions of life expectancy and of health quality based in telomere length analyses (Leslie, 2011; Wolinsky, 2011). However, biological aging is a complex process and telomere length is unable to inform of all its aspects, making it an inaccurate biomarker in many instances. Recently, several new biomarkers of age of increased accuracy and content have been developed. One of these new biomarkers is made by combining the levels of multiple

biochemical routine blood tests (Putin et al., 2016), others include information on the expression of hundreds of genes (Peters et al., 2015). The most accurate of all them are the epigenetic biomarkers (Weidner et al., 2014; Peters et al., 2015; Putin et al., 2016), which have become possible after the identification of age associated changes in DNA methylation at specific CpG sites (Fraga et al., 2005). The mechanism of these age-related changes is incompletely understood. Most experiments suggest that it involves perturbations of the DNA methylation maintenance system that lead to slowly accumulating failures along time (epigenetic drift; Hannum et al., 2013; Horvath, 2013; Teschendorff et al., 2013). The same experiments also indicate that epigenetic drift can be accelerated by somatic mutations, cell divisions, and environmental stress. The biomarkers based on these changes are referred as DNA methylation age measures (DmAM) or epigenetic clocks (Bocklandt et al., 2011; Hannum et al., 2013; Horvath, 2013; Florath et al., 2014; Weidner et al., 2014; Huang et al., 2015; Zbiec-Piekarska et al., 2015). These biomarkers combine information from several CpG sites that experience either increased or decreased methylation with age. Some of them were developed for a single tissue (Bocklandt et al., 2011; Florath et al., 2014; Weidner et al., 2014; Huang et al., 2015; Zbiec-Piekarska et al., 2015), most often blood, and others were developed and validated for multiple tissues (Hannum et al., 2013; Horvath, 2013). The DmAM in blood show good correlation with chronological age (Hannum et al., 2013; Horvath, 2013; Florath et al., 2014; Weidner et al., 2014; Huang et al., 2015; Zbiec-Piekarska et al., 2015), which is better than the obtained with telomere length (Weidner et al., 2014) and with other biological age biomarkers (Peters et al., 2015; Putin et al., 2016). In addition, the DmAM in blood show accelerated aging in progressive bone marrow failure syndromes (Weidner et al., 2014) and in Down syndrome (Horvath et al., 2015a), as well as, correlation with cognitive and physical fitness in the elderly (Marioni et al., 2015b), and with all-cause mortality in aged subjects (Marioni et al., 2015a; Christiansen et al., 2016), or the opposed association with familiar longevity (Horvath et al., 2015b). Fulfilling, therefore, all the characteristics of an accurate biomarker of biological age, useful to study how its departures from chronological age affect tissue function, organismal health and life expectancy.

Some DmAM use methylation at a large number of CpG sites (Hannum et al., 2013; Horvath, 2013), requiring whole genome methylation arrays. However, this is a too expensive technology for studies aiming to analyze biological age in a large number of samples. Alternatives with fewer CpG sites are already available for studies of saliva, 2 or 3 sites (Bocklandt et al., 2011), and WB, from 3 to 17 sites (Florath et al., 2014; Weidner et al., 2014; Huang et al., 2015; Zbiec-Piekarska et al., 2015). They still could be problematic in some settings because they require a pyrosequencer and this equipment is not available in many laboratories. In addition, the available DmAM were developed including the whole range of ages, from birth to very old age, and this is not possible without losing accuracy because the rate of changes is faster in pre-adolescents than in adults and follows different dynamics, exponential vs. lineal (Alisch et al., 2012; Horvath, 2013). Therefore, we aimed to

develop and validate a simplified DmAM with the following characteristics: using WB, requiring a single reaction per patient, calibrated for adults, and amenable to focused analysis of a few CpG sites in laboratories lacking a pyrosequencer. The technology used involves methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (MS-SNuPE; Kaminsky et al., 2005), which is based in commercially available reagents and requires a capillary sequencer.

## MATERIALS AND METHODS

### DNA Methylation Data Sets

We used four sets of blood cell DNA methylation data (Table 1). One was used for development of the DmAM and was named training set. This training set included data from the 390 donors older than 20 years from Weidner et al. (2014), which were obtained with the Illumina Human Methylation 27K BeadChip platform and are available under GSE19711, GSE20242, GSE20236, GSE23638 GEO accession numbers. The next three data collections (Table 1) were validation sets used to assess different aspects of the new DmAM. The first was from Liu et al. (2013). It was used to compare the accuracy of the new DmAM with previous DmAM. This data set includes Illumina HumanMethylation 450K BeadChip information obtained from 335 donors recruited randomly from the Swedish national population registry and publicly available with GSE42861 accession number. The second validation data set was used to evaluate the effect of heterogeneity in blood cell composition on the new DmAM. It included DNA methylation and blood cell composition from 92 individuals in the Vancouver lower mainland area, who were studied by Lam et al. (2012). Methylation data were obtained with the Illumina Human Methylation 27K BeadChip and they are available under the GSE37008 accession number. Blood cell composition included the number of monocytes, lymphocytes, neutrophils, basophils, and eosinophils assessed with an Advia 70 (Siemens Medical) system. Samples from these previous studies were according with ethical requirements as reported in the primary publications (Lam et al., 2012; Liu et al., 2013; Weidner et al., 2014). The third validation data set was obtained for this study. It was used to test the performance of the new DmAM on DNA methylation data obtained with MS-SNuPE. It included methylation data from DNA samples of 557 donors of European Spanish ancestry. These subjects were recruited as controls for studies of rheumatic diseases during ambulatory explorations. Most of them, 375, were recruited during preoperative work-up for elective minor surgeries other than joint surgery. The remaining 182 subjects were recruited during intravenous urography. Patients with bad health status (physical or mental) or with symptoms or signs of OA and patients with inflammatory or autoimmune diseases, as well as those reporting foreign ancestors were excluded. The Ethics Committee for Clinical Research of Galicia approved study of this third validation set for which all participants have given written informed consent.

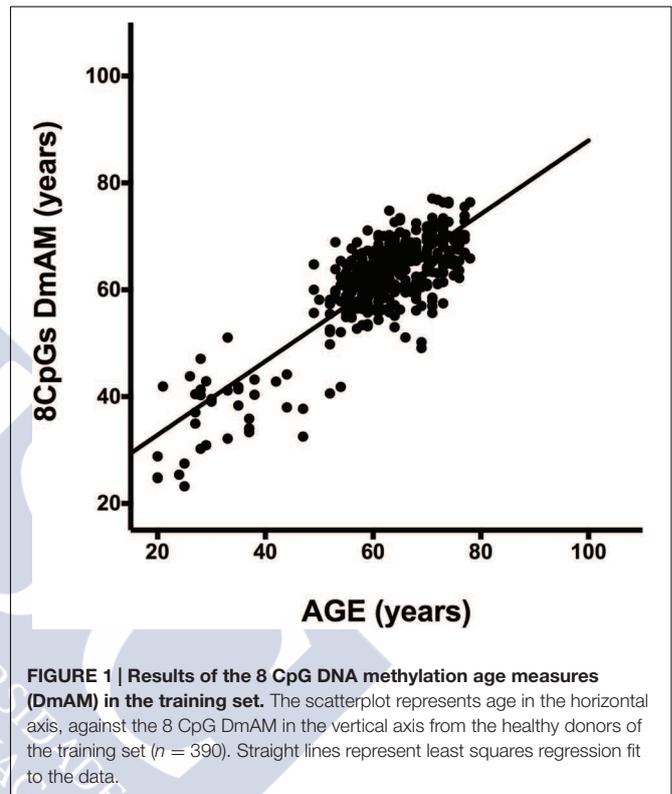
**TABLE 1 | Detailed description of the sample collections used in this study.**

| Application                                    | Study                | N   | Age (SD)    | Age range | Woman% |
|--|----------------------|-----|-------------|-----------|--------|
| Training                                       | Weidner et al., 2014 | 390 | 61.2 (11.6) | 20–78     | 96.7   |
| DNA methylation age measures (DmAM) comparison | Liu et al., 2013     | 335 | 52.8 (11.5) | 20–70     | 71.3   |
| Blood composition                              | Lam et al., 2012     | 92  | 52.8 (11.5) | 25–45     | 71.3   |
| MS-SNuPE validation                            | Current study        | 557 | 65.9 (10.0) | 45–89     | 51.4   |

N = Sample size; Age = mean age in years; SD = Standard deviation.

## Definition of DmAM Based on 8 CpGs

We used the 390 healthy Caucasian donors older than 20 years from Weidner et al. (2014), to define a DmAM optimized to estimate age from blood DNA in adult subjects and allowing assays with MS-SNuPE. The dataset contains DNA methylation profiles of 102 CpGs strongly correlated with age (Pearson correlation coefficient  $r > 0.85$  or  $r < -0.85$ ). We selected the most informative by forward stepwise linear regression. At each step, feasibility of assay by MS-SNuPE of the CpG entering the model was checked. If the assay was possible, the CpG was incorporated to the regression model, on the contrary, it was discarded and the linear regression restarted without it. A total of 8 CpGs were incorporated to the model with a 0.05 P threshold to enter. The 8 CpGs and the B coefficient values obtained with multiple linear regression on the training set are detailed in Table 2. The 8 CpG DmAM was further evaluated for accuracy with the training set and the three validation data sets. The first validation set was specifically used for comparing the 8 CpG DmAM obtained with three other DmAM (Hannum et al., 2013; Horvath, 2013; Weidner et al., 2014), because this data set included blood DNA methylation data that have not been used to calibrate any of the DmAM. The role of gender and smoking was analyzed by multiple regression against the difference between age and the DmAM estimation. The DmAM used for comparison were selected because the availability of the model parameters and of the methylation information at the required CpG sites. It should be noted that the Hannum DmAM was used without clinical variables because of lack of the necessary information (Hannum et al., 2013). Accuracy of DmAM was assessed as correlation with chronological age, and as mean difference and mean absolute deviation (MAD) between predicted age and chronological age. In the analysis of blood cell



subpopulation, cell counts were Z transformed for representation (except for basophils, which only showed 0 or 1 counts per 10  $\mu$ l). These analyses were done with Statistica 7.0 (Stat Soft, Inc.).

## Assays of DNA Methylation with MS-SNuPE

Genomic DNA, 1  $\mu$ g, was bisulfite-converted in 96 deep-well Methylation-Gold kit plates (Zymo Research, USA) following the manufacturer specifications. Oligonucleotide primers and probes for multiplex Ms-SNuPE reactions assaying the 8 selected CpGs were designed with MethPrimer (Li and Dahiya, 2002) and are provided in Supplementary Table S1. Multiplex Ms-SNuPE reactions were performed as previously described (Kaminsky et al., 2005). Optimal amounts of primers and probes were determined to avoid saturation or inefficient reaction. Reactions without bisulfite-converted DNA were included to assess specificity. All samples were assayed in duplicate and those with CV higher than 10% were repeated. A control sample was run in all plates.

**TABLE 2 | Multiple linear regression parameters of the 8 CpG DmAM.**

| Term       | B     | SE  | t-value | p-level                |
|------------|-------|-----|---------|------------------------|
| Intercept  | 84.7  | 4.3 | 19.5    | $<1.0 \times 10^{-16}$ |
| cg16386080 | 59.5  | 4.9 | 12.3    | $2.4 \times 10^{-29}$  |
| cg24768561 | 33.9  | 5.9 | 5.8     | $1.5 \times 10^{-08}$  |
| cg19761273 | -44.0 | 9.8 | 4.48    | $1.0 \times 10^{-05}$  |
| cg25809905 | -19.7 | 5.4 | 3.7     | $2.9 \times 10^{-04}$  |
| cg09809672 | -22.8 | 6.5 | 3.5     | $5.0 \times 10^{-04}$  |
| cg02228185 | -16.8 | 4.8 | 3.5     | $5.5 \times 10^{-04}$  |
| cg17471102 | -17.7 | 6.5 | 2.7     | 0.006                  |
| cg10917602 | -11.4 | 5.1 | 2.2     | 0.026                  |

This model was calibrated with the training data set. SE = Standard Error.

## RESULTS

### New DmAM Amenable for MS-SNuPE and Calibrated for Adults

We selected CpG sites for the new DmAM among the 120 CpGs with stronger correlation by forward stepwise linear regression with age in Weidner et al. (2014). For this process, we used the training set of 390 healthy subjects older than 20 years of age. At each step, we checked the CpGs for their compatibility with MS-SNuPE assays (Supplementary Table S1). The process finished with 8 CpGs, each of them showing significant contribution in multiple regression (Table 2), with 2 showing an increase in methylation with age and 6 showing a decrease. The new 8 CpG DmAM provided an accurate estimation of age in the training set ( $R^2 = 0.68$ ,  $P < 10^{-16}$ ; MAD = 5.07 years; Figure 1). In addition, accuracy was similar in different age categories from 30 to 80 years of age (Table 3). The lower age group, below 30 years of age, showed a larger MAD and larger difference in mean than the other strata (Table 3). It is worth to note that the highest accuracy is observed near the mean age of the training set. This is common to all predictions based on regression.

### Relative Accuracy of the New DmAM

We used the first validation set to assess the relative accuracy of the 8 CpG DmAM in relation with three other DmAMs (Hannum et al., 2013; Horvath, 2013; Weidner et al., 2014). This validation set includes blood DNA methylation data from 335 healthy adults (Liu et al., 2013). The best models were the two based in a large number of CpG and a sophisticated prediction model (Table 4). They showed the lowest MAD and the strongest correlation with chronological age. The DmAM of Horvath excelled in MAD and mean difference, whereas the DmAM of Hannum showed the strongest correlation with chronological age. It is important to note that the Hannum DmAM was used only with methylation data, without the clinical data included in its original description (Hannum et al., 2013).

The new 8 CpG DmAM showed an accuracy that was intermediate between the DmAM based in many CpGs and the based in few. It was nearer to any of the two best DmAM than to the Weidner DmAM in the correlation coefficients. In addition, it showed a lower mean difference between age and the DmAM estimation than the Hannum DmAM and a comparable MAD. Therefore, the 8 CpG DmAM was more accurate than the Weidner DmAM, but less accurate than the methods requiring microarray analysis of DNA methylation. These results indicate that the 8 CpG DmAM provides an improved compromise between feasibility and accuracy.

### The New 8 CpGs DmAM Was Independent of Heterogeneity in Blood Cell Counts and Other Confounding Factors

The complexity of blood composition and its variability has been mentioned as a possible confounding factor for DmAM. Therefore, we checked the influence of changes in blood cell

counts on the new 8 CpG DmAM using the second validation set (Lam et al., 2012). No association was found with cell counts of any of the major subpopulation or with variation in WB cell numbers (Figure 2). All the  $\beta$  coefficients were  $<0.03$  with  $P$ -values  $>0.6$  (Supplementary Table S2). In contrast, association with age showed a  $\beta$  coefficient of 0.77 with  $P < 10^{-17}$ .

Other possible confounding factors, sex and smoking were available in the first validation set. They were analyzed in this set because of the higher power of analysis in the 335 subjects on it (Liu et al., 2013). The 8 CpG DmAM was neither associated with smoking ( $\beta = -0.020$ ,  $P = 0.6$ ), nor with sex ( $\beta = -0.005$ ,  $P = 0.9$ ).

### Validation of the 8 CpG DmAM with MS-SNuPE

We tested accuracy of the new 8 CpG DmAM in the third set of samples, in which the 8 CpG methylation levels were determined by MS-SNuPE for the current study. The MS-SNuPE assay showed a 97.6% call rate, and a between plates reproducibility of 3.3% CV. The 8 CpG DmAM showed good accuracy in relation with the observed in other sample sets with this same DmAM and observed with other DmAM in the first validation set. The MAD and the mean difference (MAD = 6.07 years, mean difference = -2.1 years) were better than the observed in the first validation set with the same DmAM (Table 4). These differences were only slightly larger than the observed in the training set used to define the model parameters. Linear correlation with chronological age, in contrast, was weaker than the observed in the first validation set (adjusted  $R^2 = 0.45$ ,  $P < 10^{-16}$ ; Spearman  $R = 0.67$ ). However, the distribution of values was concentrated around the regression line with only some subjects showing wide differences between chronological age and the age estimated with the DmAM (Figure 3). This indicates that the decrease in correlation coefficient was related with the smaller range of ages in the third validation set (age range = 35 years, vs. 50 years in the first validation set) for an even smaller residual standard deviation (7.4 years vs. 8.2 years).

## DISCUSSION

We have developed a new DmAM that is appropriate for large studies done with blood samples of adult subjects in laboratories counting with a capillary sequencer. This DmAM has reached an improved compromise between feasibility and

TABLE 3 | Accuracy of 8 CpG DmAM in different age intervals.

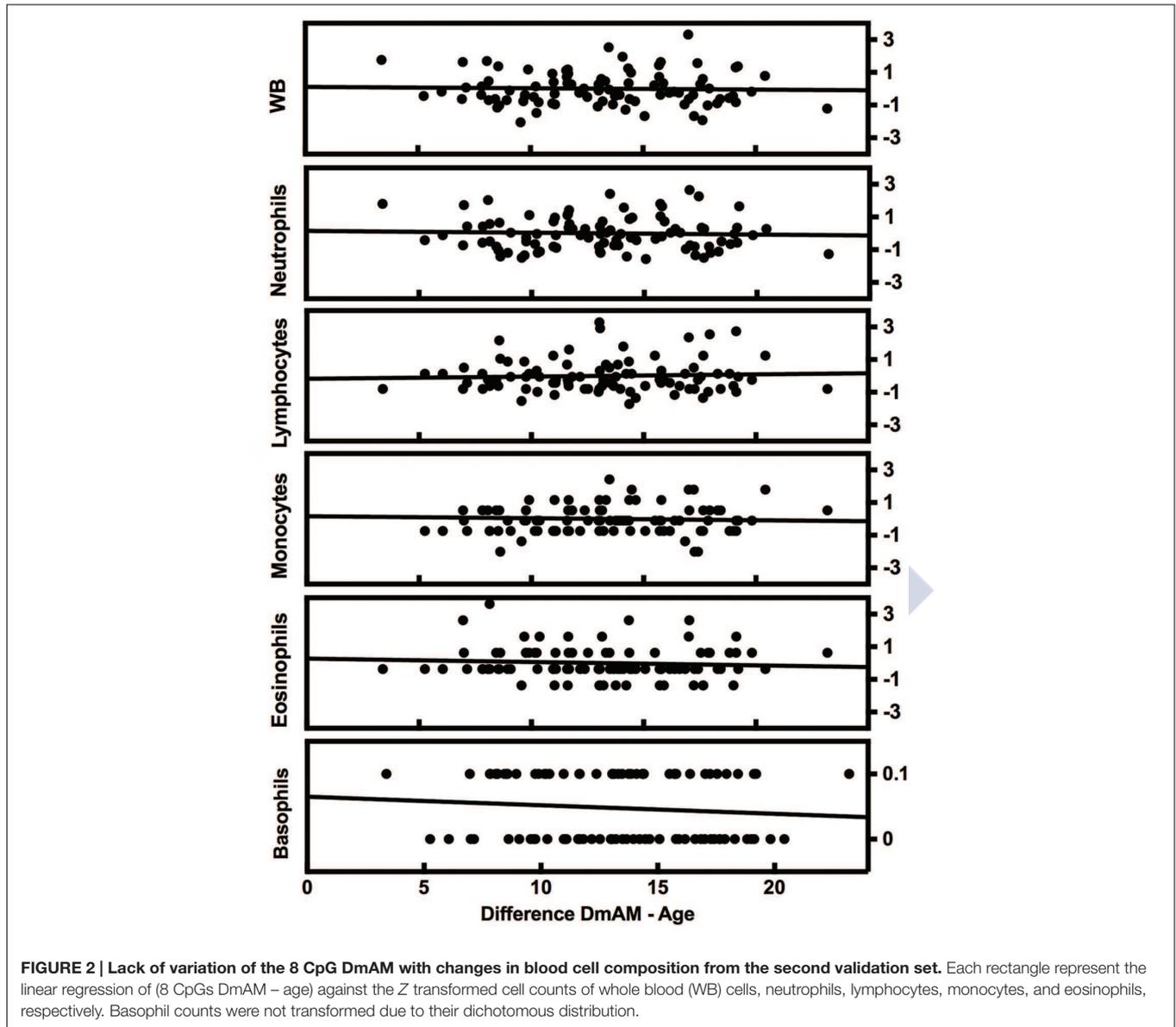
| Age interval | Mean age | N   | MAD | Mean difference |
|--------------|----------|-----|-----|-----------------|
| 20–29        | 25.4     | 17  | 9.2 | 9.0             |
| 30–49        | 39.5     | 23  | 6.6 | 3.1             |
| 50–59        | 56.3     | 93  | 4.9 | 3.6             |
| 60–69        | 64.0     | 158 | 4.1 | -0.3            |
| 70–78        | 72.8     | 99  | 5.7 | -5.2            |
| All          | 61.2     | 390 | 5.1 | 0.00            |

*N* = Sample size, MAD = Mean absolute deviation.

**TABLE 4 | Comparative performance of the 8 CpG DmAM with other DmAM in the 335 blood samples from the first validation set.**

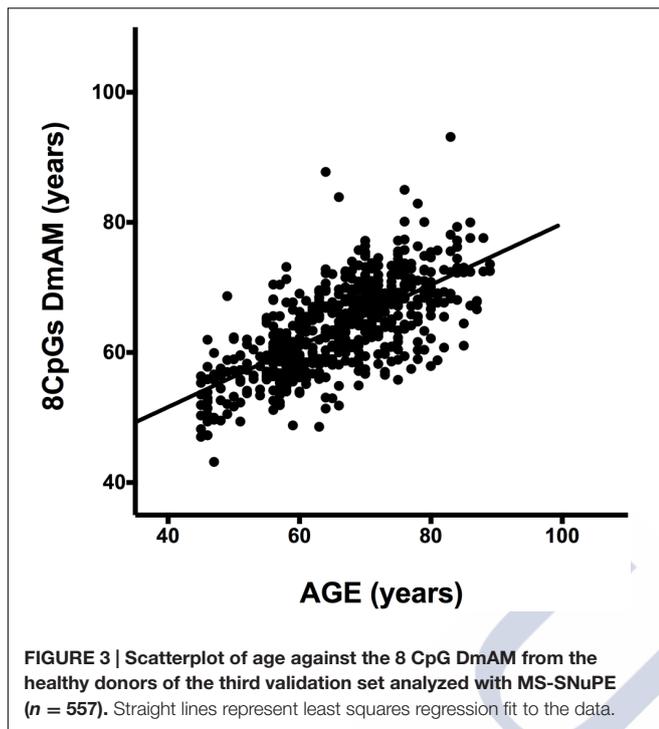
| DmAM                 | N° CpGs | MAD | Adjusted $R^2$ | Spearman rho | Mean difference |
|----------------------|---------|-----|----------------|--------------|-----------------|
| Horvath, 2013        | 353     | 4.4 | 0.77           | 0.87         | -1.0            |
| Hannum et al., 2013  | 71      | 7.1 | 0.84           | 0.90         | -6.7            |
| 8 CpGs               | 8       | 7.3 | 0.60           | 0.75         | -4.8            |
| Weidner et al., 2014 | 3       | 8.5 | 0.33           | 0.57         | 3.8             |

MAD = Mean absolute deviation.



accuracy. It allows detection of changes in epigenetic aging with accuracy slightly lower than DmAM that are much more costly per sample because they require whole genome DNA methylation microarrays (Hannum et al., 2013; Horvath, 2013). In addition, it provides results that are independent of important confounders and easily comparable with the obtained with other technologies.

The DNA methylation microarrays provide a large wealth of information that could be of interest for other analyses, but their cost is excessive if the objective is only to assess epigenetic age. This consideration has led to the development of DmAM with few CpG sites for large epidemiological studies, and forensic applications (Bocklandt et al., 2011; Florath et al., 2014; Weidner et al., 2014; Huang et al., 2015; Zbiac-Piekarska et al., 2015).



Among the DmAM requiring few CpG sites, the new 8 CpG DmAM showed better accuracy in our analyses than other DmAM developed also for blood samples (Weidner et al., 2014). Unfortunately, a direct comparison with the other DmAM in this category was impossible because of lack of the necessary information, either because the CpG sites are not in DNA microarrays or because the model parameters were not reported (Florath et al., 2014; Huang et al., 2015; Zbiec-Piekarska et al., 2015). Independently of their accuracy, which we will further consider below, all the other DmAM based on few CpG are designed for assay by pyrosequencing, which is not available in many laboratories. The accuracy of this type of DmAM increases with the inclusion of additional CpGs (Bocklandt et al., 2011; Weidner et al., 2014), but each new CpG requires a new reaction with its associated cost and time. In contrast, the MS-SNuPE technology has the advantage of its multiplexing nature allowing the analysis of the 8 CpG DmAM in a single reaction reducing the expenses and the time needed (Kaminsky et al., 2005). We have estimated that the 8 CpG DmAM will require about 32 h after bisulfite modification whereas the MS-SNuPE needs 8 h in equipment that is widely available: a PCR thermocycler and a capillary sequencer.

It is important to note that accuracy of any of the DmAM is partly age dependent, and this dependence has two components. The first is due to the difference between the training set mean age and the age to be estimated. The best age estimations are obtained near the mean value of the training set, because the regression parameters are estimated with this set. This dependence means that regression parameters show bias in other sample collections different from the training set. The second component is due to the range of ages considered. This range

affects correlation coefficients as measures of accuracy. Because of the correlation coefficient formula, a wide range of ages leads to higher correlation coefficients than a narrow range for the same dispersion of data around the regression line. In addition, the range of ages affects accuracy of the estimation due to the different dynamics of DNA methylation changes with age in children and in adults, as already mentioned (Alisch et al., 2012; Horvath, 2013). This variation means that accurate results are difficult with DmAM aiming to cover all age ranges (Horvath, 2013; Zbiec-Piekarska et al., 2015). Therefore, we choose restricting development of a new DmAM to adults. This approach is safer than assuming a constant rate of change of the DmAM for all ages from birth to very old, as has been done by some previous DmAM (Bocklandt et al., 2011; Hannum et al., 2013; Weidner et al., 2014; Huang et al., 2015; Zbiec-Piekarska et al., 2015). An alternative and accurate approach has been followed by the Horvath DmAM, which achieved good accuracy along all age ranges thanks to an elastic net regression model that accounted for a variable rate of change (Horvath, 2013). All the mentioned sources of experiment-specific effects on accuracy of DmAM indicate the need to compare DmAM in the same set of samples, as we have done here.

The previous consideration leads to highlight another good property of the 8 CpG DmAM. The 8 CpG sites included in the new DmAM are amenable to analysis with any of the common technologies for DNA methylation analysis. They were selected as amenable to MS-SNuPE, among CpG sites available in both Illumina 27K and 450K Bead Chip methylation arrays, and they are amenable to study with pyrosequencing. This characteristic allows a wide comparability with other DmAM in the same data set.

An important consideration for the interpretation of DmAM is their degree of dependence of blood cell composition (Jaffe and Irizarry, 2014). Ideally, the DmAM should be independent of commonly observed changes in blood cell composition. Our analysis showed this independence for the new 8 CpG DmAM in the 92 samples from our second validation sample set (Lam et al., 2012). Some previous DmAM have also demonstrated this property (Horvath, 2013; Weidner et al., 2014). In addition, the 8 CpG DmAM was independent of sex, and smoking habit. This independence could be an advantage over other DmAM that should be adjusted for these confounders (Hannum et al., 2013; Florath et al., 2014).

## CONCLUSION

We propose a new DmAM for large studies of biological age in blood samples of adults that is amenable to analysis in a single reaction with MS-SNuPE. This DmAM involving 8 CpG sites represents an improvement either in feasibility or in accuracy over previous DmAM.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design the study: LV and AG; Acquisition and analysis of data: YL and LV; Drafting of the article: LV and AG;

Critical revision of the article: YL; Final approval of the version to be published: LV, YL, and AG; Agreement to be accountable for all aspects of the work: LV, YL, and AG.

## FUNDING

Funding was provided by the Instituto de Salud Carlos III (Spain) through grants PI14/01651 and RD12/009/008, which are partially financed by the European Regional Development Fund of the EU (FEDER).

## REFERENCES

- Alisch, R. S., Barwick, B. G., Chopra, P., Myrick, L. K., Satten, G. A., Conneely, K. N., et al. (2012). Age-associated DNA methylation in pediatric populations. *Genome Res.* 22, 623–632. doi: 10.1101/gr.125187.111
- Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M. E., Sanchez, F. J., Sinsheimer, J. S., Horvath, S., et al. (2011). Epigenetic predictor of age. *PLoS ONE* 6:e14821. doi: 10.1371/journal.pone.0014821
- Christiansen, L., Lenart, A., Tan, Q., Vaupel, J. W., Aviv, A., McGue, M., et al. (2016). DNA methylation age is associated with mortality in a longitudinal Danish twin study. *Aging Cell* 15, 149–154. doi: 10.1111/acel.12421
- Florath, I., Butterbach, K., Muller, H., Bewerunge-Hudler, M., and Brenner, H. (2014). Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1186–1201. doi: 10.1093/hmg/ddt531
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., et al. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10604–10609. doi: 10.1073/pnas.0500398102
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., et al. (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol. Cell* 49, 359–367. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.016
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 14:R115. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115
- Horvath, S., Garagnani, P., Bacalini, M. G., Pirazzini, C., Salvioli, S., Gentilini, D., et al. (2015a). Accelerated epigenetic aging in down syndrome. *Aging Cell* 14, 491–495. doi: 10.1111/acel.12325
- Horvath, S., Pirazzini, C., Bacalini, M. G., Gentilini, D., Di Blasio, A. M., Delledonne, M., et al. (2015b). Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging (Albany NY)* 7, 1159–1170. doi: 10.18632/aging.100861
- Huang, Y., Yan, J., Hou, J., Fu, X., Li, L., and Hou, Y. (2015). Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. *Forensic Sci. Int. Genet.* 17, 129–136. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.05.007
- Jaffe, A. E., and Irizarry, R. A. (2014). Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. *Genome Biol.* 15:R31. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r31
- Kaminsky, Z. A., Assadzadeh, A., Flanagan, J., and Petronis, A. (2005). Single nucleotide extension technology for quantitative site-specific evaluation of metC/C in GC-rich regions. *Nucleic Acids Res.* 33:e95. doi: 10.1093/nar/gni094
- Lam, L. L., Emberly, E., Fraser, H. B., Neumann, S. M., Chen, E., Miller, G. E., et al. (2012). Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(Suppl. 2), 17253–17260. doi: 10.1073/pnas.1121249109
- Leslie, M. (2011). Cell biology. Are telomere tests ready for prime time? *Science* 332, 414–415. doi: 10.1126/science.332.6028.414
- Li, L. C., and Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18, 1427–1431. doi: 10.1093/bioinformatics/18.11.1427
- Liu, Y., Aryee, M. J., Padyukov, L., Fallin, M. D., Hesselberg, E., Runarsson, A., et al. (2013). Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Carmen Pena for her excellent technical support.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2016.00126>

- an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat. Biotechnol.* 31, 142–147. doi: 10.1038/nbt.2487
- Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
- Marioni, R. E., Shah, S., McRae, A. F., Chen, B. H., Colicino, E., Harris, S. E., et al. (2015a). DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol.* 16:25. doi: 10.1186/s13059-015-0584-6
- Marioni, R. E., Shah, S., McRae, A. F., Ritchie, S. J., Muniz-Terrera, G., Harris, S. E., et al. (2015b). The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *Int. J. Epidemiol.* 44, 1388–1396. doi: 10.1093/ije/dyu277
- Oeseburg, H., de Boer, R. A., van Gilst, W. H., and van der Harst, P. (2010). Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch.* 459, 259–268. doi: 10.1007/s00424-009-0728-1
- Peters, M. J., Joehanes, R., Pilling, L. C., Schurmann, C., Conneely, K. N., Powell, J., et al. (2015). The transcriptional landscape of age in human peripheral blood. *Nat. Commun.* 6:8570. doi: 10.1038/ncomms9570
- Putin, E., Mamoshina, P., Aliper, A., Korzinkin, M., Moskalev, A., Kolosov, A., et al. (2016). Deep biomarkers of human aging: application of deep neural networks to biomarker development. *Aging (Albany N.Y.)* 8, 1021–1033. doi: 10.18632/aging.100968
- Teschendorff, A. E., West, J., and Beck, S. (2013). Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Hum. Mol. Genet.* 22, R7–R15. doi: 10.1093/hmg/ddt375
- Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., et al. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* 15:R24. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r24
- Wolinsky, H. (2011). Testing time for telomeres. Telomere length can tell us something about disease susceptibility and ageing, but are commercial tests ready for prime time? *EMBO Rep.* 12, 897–900. doi: 10.1038/embor.2011.166
- Zbiec-Piekarska, R., Spolnicka, M., Kupiec, T., Parys-Proszek, A., Makowska, Z., Paleczka, A., et al. (2015). Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci. Int. Genet.* 17, 173–179. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.05.001
- Zhu, H., Belcher, M., and van der Harst, P. (2011). Healthy aging and disease: role for telomere biology? *Clin. Sci. (Lond.)* 120, 427–440. doi: 10.1042/CS20100385

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Vidal-Bralo, Lopez-Golan and Gonzalez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## Specific premature epigenetic aging of cartilage in osteoarthritis

Laura Vidal-Bralo<sup>1</sup>, Yolanda Lopez-Golan<sup>1</sup>, Antonio Mera-Varela<sup>1</sup>, Ignacio Rego-Perez<sup>2</sup>, Steve Horvath<sup>3</sup>, Yuhua Zhang<sup>4</sup>, Álvaro del Real<sup>5</sup>, Guangju Zhai<sup>4</sup>, Francisco J Blanco<sup>2</sup>, Jose A. Riancho<sup>5</sup>, Juan J Gomez-Reino<sup>1</sup>, Antonio Gonzalez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Investigacion 10 and Rheumatology Unit, Instituto Investigacion Sanitaria, Hospital Clinico Universitario de Santiago, Travesia Choupana, sn. 15706- Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup>Grupo de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña, Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, Universidade da Coruña. As Xubias, sn. 15006- A Coruña, Spain

<sup>3</sup>Department of Human Genetics, David Geffen School of Medicine, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA

<sup>4</sup>Discipline of Genetics, Faculty of Medicine, Memorial University of Newfoundland, A1B- St. John's, NL, Canada

<sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Hospital U. M. Valdecilla-IDIVAL, University of Cantabria, Cardenal Herrera Oria, 39011, Santander, Spain

**Correspondence to:** Antonio Gonzalez; **email:** [agmartinezp@ser.es](mailto:agmartinezp@ser.es)

**Keywords:** osteoarthritis, biological age, epigenetics, DNA methylation, telomere length shortening

**Received:** June 14, 2016 **Accepted:** September 14, 2016 **Published:** September 28, 2016

### ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a disease affecting multiple tissues of the joints in the elderly, but most notably articular cartilage. Premature biological aging has been described in this tissue and in blood cells, suggesting a systemic component of premature aging in the pathogenesis of OA. Here, we have explored epigenetic aging in OA at the local (cartilage and bone) and systemic (blood) levels. Two DNA methylation age-measures (DmAM) were used: the multi-tissue age estimator for cartilage and bone; and a blood-specific biomarker for blood. Differences in DmAM between OA patients and controls showed an accelerated aging of 3.7 years in articular cartilage (95 % CI = 1.1 to 6.3,  $P = 0.008$ ) of OA patients. By contrast, no difference in epigenetic aging was observed in bone (0.04 years; 95 % CI = -1.8 to 1.9,  $P = 0.3$ ) and in blood (-0.6 years; 95 % CI = -1.5 to 0.3,  $P = 0.2$ ) between OA patients and controls. Therefore, premature epigenetic aging according to DNA methylation changes was specific of OA cartilage, adding further evidence and insight on premature aging of cartilage as a component of OA pathogenesis that reflects damage and vulnerability.

### INTRODUCTION

OA is the most common chronic disease affecting the joints with about a 45 % lifetime risk of developing OA of the knee [1, 2]. It can affect any joint, but it occurs most often in knees, hips, spine, or hands. Symptoms include pain and stiffness, bony enlargement, crepitus with movement and decreased function of the joint. OA pathogenesis is complex and includes multiple risk factors that are still incompletely known, but old age is a critical contributor [3, 4]. The relationship between old age and OA is not fully understood. Classically, it

was suspected that the association was related to the “wear and tear” of articular cartilage by continuous mechanical stress. Today, we know that this model of OA is insufficient because OA involves an active response to injury comprising remodeling of articular cartilage and neighboring bone, in addition of synovial inflammation and damage to ligaments and menisci [2]. In addition, the other component of the association with old age, biological aging, has shown unsuspected complexity, including its multidimensionality, variable progression, possibility of modulation and the pivotal role played by senescent cells [5].

The many facets of biological aging have been typified in nine cellular and molecular hallmarks: genomic instability, telomere attrition, epigenetic alterations, loss of proteostasis, deregulated nutrient sensing, mitochondrial dysfunction, cellular senescence, stem cell exhaustion, and altered intercellular communication [6]. Variable progression of biological aging with dissociation between biological and chronological age is observed in progeroid syndromes. Less dramatically, it is also observed as a reflection of lifestyle with smoking, heavy drinking, obesity, stress and depression as accelerators, and exercise and caloric restriction as rejuvenators. The pivotal role of cellular senescence and of the senescence-associated secretory phenotype has been established in multiple studies, but most strikingly with the reversal of age-associated changes obtained with their removal [7]. This rejuvenation has been obtained either through genetic manipulation or with senolytic drugs in mice in spite of the eliminated senescent cells were only a minor fraction in mouse tissues [5]. All these aspects could be of relevance for OA as exemplified by the secretory phenotype that includes secretion of metalloproteases and pro-inflammatory mediators, which could be involved in OA cartilage damage [2-4]. There is already persuasive evidence of accelerated biological aging at the affected cartilage [3, 4]. Many of the aging hallmarks have been described as exacerbated in OA chondrocytes and articular cartilage, including telomere length shortening, mitochondrial dysfunction, cellular senescence and genome instability [3, 4]. In contrast, biological age has not been studied in any other joint tissue although a systemic component of premature aging has been suggested by accelerated telomere length shortening in blood cells of 160 hand OA subjects compared with 926 controls [8]. Telomere shortening correlated with radiographic severity of OA in the hands in this study. These findings have not yet been independently confirmed, with a small subsequent study showing no telomere attrition in blood of knee OA patients [9], and a second small study reporting telomere shortening only in knee OA patients experiencing high stress and chronic pain [10]. A systemic premature aging component in OA is an attractive hypothesis because it is congruent with some epidemiological studies that have found increased prevalence of old-age comorbidities [11-14], frailty [15], and mortality in OA patients [16-18]. The two aspects, local and systemic, of premature aging could contribute to OA by further impairing cartilage and joint function, decreasing mobility and increasing joint vulnerability.

An opportunity to explore a different aging hallmark in OA cartilage, bone and blood has become possible thanks to the recent development of biomarkers of epigenetic aging [19-24]. The available biomarkers,

called DNA methylation age-measures (DmAM), combine methylation levels at CpG sites that experience methylation changes with aging. The mechanism seems to include slowly accumulating failures of methylation maintenance (epigenetic drift) that could be accelerated by somatic mutations, cell divisions and environmental stress [19, 21, 25, 26]. Some of the changes are tissue-specific; others are shared by several tissues. This motivates a distinction between DmAM that are tissue-specific and include as few as 3 CpG sites showing strong correlation with age in blood, [20, 24] or in saliva [23], and biomarkers applicable to many tissues that require investigating more CpG sites [19, 21]. The most comprehensive is the "epigenetic clock" method by Horvath, which includes 353 CpG and is valid for multiple tissues including bone and cartilage [19, 27, 28]. The DmAM are useful biomarkers of biological age that show accelerated aging in several diseases of old age [19-21, 29, 30] and in subjects under elevated lifetime stress [26], and that correlate with cognitive and physical fitness in the elderly and with all-cause and cause-specific mortality [30-35].

## RESULTS

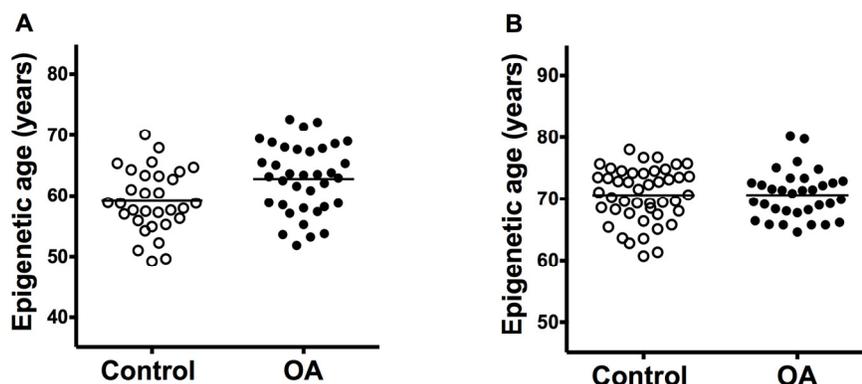
The cartilage samples from OA patients showed premature aging in comparison with cartilage from controls (Figure 1A). The difference in the estimated mean age obtained with Horvath's DmAM was of 3.7 years (Table 1). This result was obtained with the whole set of samples that included cartilage from the tibial plateau and from the femoral head. A significant premature aging was also observed with the subgroup of tibial plateau samples, with a mean difference of 5.3 years (95 % CI = 2.4 to 8.2). Cartilages from the femoral heads were too few for meaningful analysis. All the comparisons were adjusted for age and sex as covariates.

In contrast with the cartilage results, there were no differences in epigenetic aging of bone (Figure 1B). The mean estimated age obtained from DNA methylation data was very similar in patients with hip OA and in controls (Table 1). The lack of difference was validated in a sub-analysis including only the fracture controls ( $\Delta$ DmAM = 0.5 years, 95 % CI = -1.50 to 2.54,  $P$  = 0.6). Bone samples from cadaver controls were too few for meaningful analysis. All the comparisons were adjusted for age and sex as covariates.

The study of epigenetic aging in blood required de novo analyzes of methylation levels at the 8 CpG sites. The MS-SNuPE assays showed a 93.0 % call rate, and between-plate CV of 3.2 %. Age of the 182 controls without OA was accurately predicted with the 8CpG DmAM (Figure 2), as shown by the good fit of the mean age estimate (mean difference age – DmAM = -

0.1 years, SD = 8.7 years). Comparison of the epigenetic ages obtained in this way did not show differences between OA patients and controls (Figure 2). The epigenetic ages for each of the joint-specific OA subgroups were very similar to the epigenetic age for the control subjects, as shown for the hand OA patients (Figure 2A), knee OA patients (Figure 2B) and hip OA

patients (Figure 2C). This similarity in blood cells was clearly shown by the near zero year  $\Delta$ DmAM (Table 1). The largest difference in blood was observed between patients with hip OA and controls, but it was not significant and with direction opposed to premature aging in the OA subjects. All the comparisons were adjusted for age and sex as covariates.



**Figure 1. Comparison of epigenetic age in joint tissues from controls and patients with OA.** (A) Accelerated aging in OA cartilage samples (n = 31) in comparison with control cartilage (n = 36) with  $\Delta$ DmAM = 3.7 years (P = 0.008); and (B) no difference ( $\Delta$ DmAM = 0.04 years, P = 0.3) in bone samples between OA patients (n = 33) and controls (n = 45). Epigenetic ages are represented as age- and sex-adjusted values with horizontal lines for the mean of each group.

**Table 1. Specific premature epigenetic aging in OA cartilage compared with control cartilage.**  $\Delta$ DmAM = (age- and sex-adjusted mean DmAM in OA patients) – (age- and sex-adjusted mean DmAM in controls); CI = confidence interval.

| Tissue    | OA set   | $\Delta$ DmAM <sup>a</sup> (95% CI) | P-value |
|-----------|----------|-------------------------------------|---------|
| Cartilage | Knee/hip | 3.7 (1.1 to 6.3)                    | 0.008   |
|           |          |                                     |         |
| Bone      | Hip      | 0.04 (-1.8 to 1.9)                  | 0.3     |
|           |          |                                     |         |
| Blood     | Hand     | 0.01 (-1.1 to 1.1)                  | 0.98    |
|           | Knee     | 0.04 (-0.9 to 1.0)                  | 0.9     |
|           | Hip      | -0.7 (-1.7 to 0.3)                  | 0.11    |

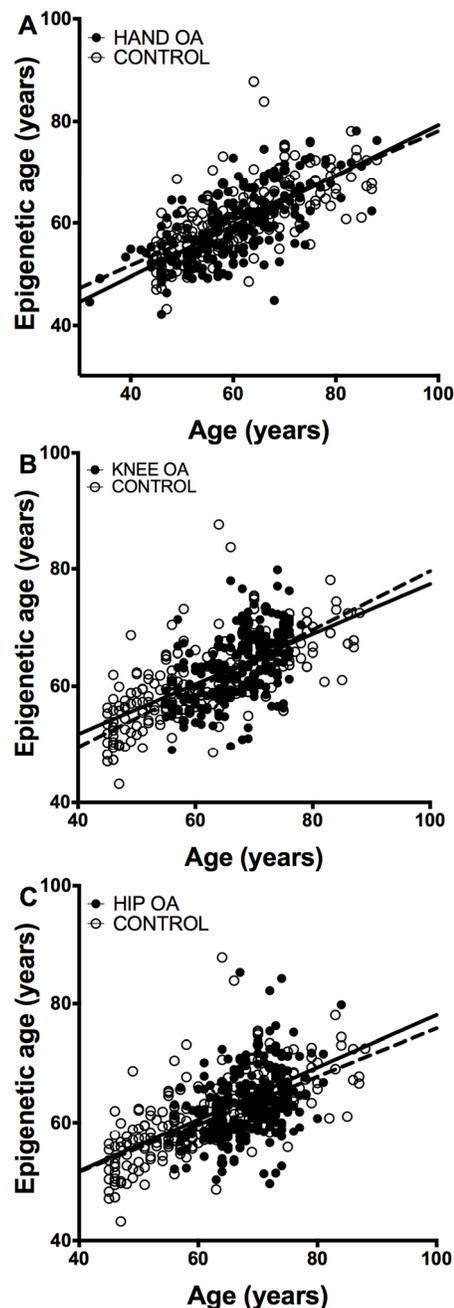
## DISCUSSION

Our results showed for the first time premature epigenetic aging as detected with DmAM in cartilage of the OA affected joint, but not in bone nearby the OA affected joint, or in blood cells of OA patients irrespective of the joint affected. These results add epigenetic aging to the list of hallmarks of aging showing accelerated changes in OA cartilage. Each of these hallmarks provide complementary and non-redundant evidence of the different facets of the premature biological aging taking place in chondrocytes and the extracellular matrix of the OA affected cartilage. In addition, our results could be interpreted as questioning systemic premature aging in OA, or even a local component of premature aging in nearby bone, but exploration of other aging hallmarks would be required to exclude them.

Previously, several hallmarks of biological aging have been found exacerbated in chondrocytes and cartilage from OA patients [3, 4]. Our work adds epigenetic aging to the list of hallmarks that show premature biological aging in this tissue. This is a significant addition because the different aging hallmarks, although extensively interconnected, show tissue and disease specificity and the involvement of each of them cannot be assumed from the presence of other hallmarks [5, 6, 35]. They need to be tested in the specific tissue or situation under study. This necessity is exemplified by the lack of correlation between epigenetic age and telomere length observed in the elderly population [35]. In addition, diseases of abnormal telomere attrition are different from diseases in which the dominant mechanism is genomic instability and both are different from normal aging. The first group includes pulmonary fibrosis, dyskeratosis congenita and aplastic anemia, whereas genome instability is the dominant aging hallmark in progeroid syndromes such as Hutchinson-Gilford progeria syndrome and Werner's syndrome [5, 6]. In addition, the DNA methylation changes that are included in the Horvath DmAM have been shown to be independent from cellular senescence and mitotic age [19]. Similar lack of redundancy is observed between the other aging hallmarks, making it necessary to study each of them to know their involvement in OA.

Epigenetic changes with age are not restricted to DNA methylation. They encompass also histone modifications regulated by sirtuins and chromatin remodeling [6]. None of the other age-associated epigenetic changes has yet been analyzed in the context of OA, but they are of interest given their potential reversibility as with histone deacetylase inhibitors or inhibitors of histone acetyltransferases as anti-aging drugs [6]. The meaning of these epigenetic changes is still poorly understood.

They likely contribute to the loss of transcriptional regulation and increase of transcriptional noise observed with aging [5, 6]. Changes in DNA methylation are concentrated in genes with some functional categories including cell growth and survival, organismal development and cancer [19], and in sites within gluco-



**Figure 2. Lack of accelerated epigenetic aging in blood cells of OA patients.** The scatterplots represent age in the horizontal axis against epigenetic age in the vertical axis from the controls without OA (empty circles,  $n=182$ ) together with (A) the hand OA ( $n=206$ ), (B) the knee OA ( $n=229$ ), and (C) the hip OA ( $n=273$ ) patients (filled circles). Straight lines represent least squares regression fit to the data.

corticoid response elements [26], but the pattern of hypermethylation and hypomethylation has not yet been linked to specific molecular or cellular processes [19, 20]. Interpretation of the changes should also include the magnitude of the change: the increase in 3.7 years in  $\Delta$ DmAM observed in the OA cartilage samples of our study is a modest acceleration compared with changes observed in tumoral tissue, but similar to the reported in a recent abstract in hip OA cartilage, which provides independent confirmation of our findings [36], and in blood of HIV infected patients [37], or in blood of Down syndrome patients [29], but larger than the observed in blood from patients with Parkinson disease [38], or in blood of women after menopause [39].

Some of the previously described aging hallmarks are strongest in the damaged cartilage and less clear in cartilage of preserved areas. Hallmarks showing this pattern are mean telomere length shortening [40-42] senescence-associated heterochromatin foci [41, 42], and senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal). These results have been interpreted as representing, at least in part, consequences of cellular stress and the senescence status of the chondrocytes in OA. However, it is possible that epigenetic aging is a biomarker of cellular vulnerability more than of damage and, therefore, a potential target for treatment. Experiments aimed to differentiate between the two mechanisms are necessary but there are already preliminary results showing similar epigenetic aging in damaged and in preserved cartilage from the same OA patient [36]. Potential treatments could include specific senolytic drugs [5] that have not yet been assayed in chondrocytes, and other approaches with capacity to delay aging in OA chondrocytes as already shown for statins [38] and sirtuin activation [37, 39].

Our results are contrary to widespread premature epigenetic aging given the lack of increased  $\Delta$ DmAM at the blood and bone levels. However, the only previous direct evidence of a systemic component of accelerated aging in OA was obtained with telomere length in blood cells of OA patients [8, 10], and it is likely that telomere length and DmAM capture different aspects of biological aging [6, 19, 21, 25, 27]. Telomere attrition results from cell divisions, in the absence of the enzyme telomerase, and from DNA damage induced by extrinsic stress, as oxidative or inflammatory stress. The authors that found accelerated telomere length attrition in blood of OA patient interpreted it as reflecting oxidative stress and low-level chronic inflammation [8], or associated with chronic pain and high stress [10]. In contrast, epigenetic aging as measured with DmAM seems to be due to perturbations of the DNA methylation maintenance system [19, 21, 25]. Therefore, our results do not question systemic accelerated aging as detected with

telomere shortening, but exclude the epigenetic aspect of aging.

The lack of accelerated aging in blood and in bone was not attributable to insufficient power. In effect, blood samples were enough to exclude  $\Delta$ DmAM half as fast as the observed in cartilage ( $1-\beta > 0.95$  to exclude a difference of 1.83 years for each of the three joints). Bone samples, in turn, were enough to detect  $\Delta$ DmAM as large as the observed in cartilage ( $1-\beta = 0.90$ ). In addition, the use of different DmAM for cartilage and bone, in one side, and for blood, in the other, does not interfere with our results because no analysis compared results across different DmAM. We also avoided biases due to differences in age or sex between the OA patients and the controls by adjusting for these two variables, as recommended [19-21]. However, limitations of our study are that the different tissues were not from the same subjects, the lack of other joint tissues, and the absence of a larger number of cartilage samples from femoral heads allowing specific analysis of epigenetic aging at this site. The meaning of these limitations seems modest because bone and cartilage are arguably the most relevant tissues in OA [2], and because epigenetic aging in hip cartilage from OA patients has been independently found [36], as already mentioned. In any case, we cannot completely exclude that other tissues or joints show a different behavior than the reporter here, or that additional insight could be gained from analyzing several tissues from the same subjects, as epigenetic age correlation between tissues.

In summary, we have found specific accelerated aging as measured with DNA methylation in cartilage from OA affected joints. Knowledge of the mechanisms of this type of premature aging will help to understand OA pathology, but already it is apparent that these particular mechanisms are not widespread. This was indicated by the results obtained with the same DNA methylation methodology in bone near the affected joint and in blood cells. They showed absence of a systemic component of premature aging. These results cannot exclude that other hallmarks of aging could be more widespread than the DNA methylation changes analyzed here.

## METHODS

### Cartilage and bone epigenetic age

Epigenetic age was estimated with the 353 age-related CpG probes according with Horvath [19]. Methylation information of these sites has been obtained in previous studies addressing cartilage and bone samples (Table 2 and Supplementary Table 1) [43-46]. Cartilage samples were from 31 controls and 36 OA patients (Table 2).

**Table 2. Main characteristics of the sample collections used in this study.** N = number of samples, SD = standard deviation.

| Tissue    | Set                           | N   | Age                  |         |
|-----------|-------------------------------|-----|----------------------|---------|
|           |                               |     | Mean ± SD (Range)    | Woman % |
| Cartilage | Control knee/hip <sup>a</sup> | 31  | 64.8 ± 15.0 (40-95)  | 48.4    |
|           | Knee/hip OA                   | 36  | 67.1 ± 9.3 (41-80)   | 75.0    |
| Bone      | Control hip <sup>a</sup>      | 45  | 78.0 ± 11.0 (40-104) | 93.3    |
|           | Hip OA                        | 33  | 75.4 ± 6.7 (58-89)   | 100.0   |
| Blood     | Control                       | 182 | 60.7 ± 11.5 (45-88)  | 46.7    |
|           | Hand OA                       | 206 | 60.6 ± 10.1 (32-88)  | 88.4    |
|           | Knee OA                       | 229 | 67.7 ± 5.6 (55-78)   | 82.1    |
|           | Hip OA                        | 273 | 68.4 ± 5.5 (55-84)   | 59.7    |

<sup>a</sup> 3 cartilage and 4 bone control samples were from undefined localization

The controls were from tibial plateau of 18 cadavers with no macroscopic signs of OA [43], and the femoral head of 10 subjects with hip fracture and without macroscopic or microscopic evidence of OA [46]. In addition, 3 cartilage samples from cadavers without information of status and location were included [45]. The OA samples included 29 from the tibial plateau of severe knee OA patients [43, 46], and 7 from the femoral head of severe hip OA patients [46], obtained at the time of joint replacement. Bone samples were from 45 controls and 33 hip OA patients (Table 2). The controls included femoral heads of 34 subjects with osteoporotic hip fracture (OP) and 7 cadavers [44]. They lacked OA lesions on macroscopic examination of the hip joints and the bone pieces excluded subchondral and fractured regions. Patients with fractures due to high-energy trauma or with disorders causing secondary OP or OA were not included. In addition, 4 control bone samples from cadavers that lacked detailed information of status and place of retrieval were included.[45] The bone samples of the 33 hip OA patients were obtained from femoral heads at the time of total joint replacement for primary hip OA [44]. Methylation data were obtained either with the Human Methylation 27 BeadChip (Illumina), [43, 44] or with the HumanMethylation 450 Bead-Chip microarray (Illumina, San Diego, California, USA) [45, 46]. These samples were obtained with informed consent of the donors and approval of the relevant ethics committees as reported in the primary publications [43-46].

#### Analysis of epigenetic aging in blood

Epigenetic aging in blood was assessed with a 8 CpG DmAM specific for whole blood and amenable to assay in large number of samples [24]. Methylation data were obtained for this study with methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (MS-SNuPE) following the reported procedure [47]. Genomic DNA from 890 subjects of Spanish ancestry was assayed (Table 2 and Supplementary Table 1). This collection of samples included 182 controls recruited at the time of intravenous urography. They had not OA signs at exploration including both hands or in the radiographs either at the hip or column joints, and they did not complain of OA symptoms in a systematic questionnaire. The remaining 708 subjects were suffering from primary OA as assessed by a rheumatologist. The subjects affected by knee OA, 229, or hip OA, 273, were selected from consecutive patients aged 55–75 years at the time of surgery that were undergoing total joint replacement. The patients with hand OA, 206, were selected among those attending the Rheumatology Unit fulfilling the American College of Rheumatology classification criteria for hand OA [48]. Exclusion criteria were inflammatory, infectious, traumatic or congenic joint pathology, as well as, lesions due to crystal deposition or osteonecrosis. Morbid obesity and occupational strain were not exclusion causes. All donors provided blood DNA samples for genetic studies with written informed consent according to the

Declaration of Helsinki (most recently at the General Assembly on October 2008) and the approval of the Ethics Committee for Clinical Research of Galicia, as described [49].

### Statistical analysis

We estimated the epigenetic age of the cartilage and bone samples with Horvath's DmAM [19], and of the blood samples with the 8 CpG DmAM [24]. Comparisons between samples from OA patients and controls were done with analysis of variance (ANOVA) including age and sex as covariates. Mean differences in DmAM estimates ( $\Delta$ DmAM) were calculated as:

$$\Delta\text{DmAM} = (\text{age- and sex-adjusted mean DmAM in OA patients}) - (\text{age- and sex-adjusted mean DmAM in controls})$$

Age- and sex-adjustment was done with the residuals from multiple linear regression of estimated age *versus* age and sex. All these analyses were done with Statistica 7.0 (Stat Soft, Inc.). Post-hoc power analysis was done with G\*Power 3 for  $\alpha = 0.05$  [50].

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the patients that generously have contributed the samples and time to this work. They also thank Carmen Pena for her excellent technical support.

### FUNDING

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Spain) [grants PI14/01651, PI12/01909, RD12/009/008, and P12/615] with participation of the European Regional Development Fund of the EU (FEDER).

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare they have no conflict of interest.

### REFERENCES

1. Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, Renner JB, Tudor G, Koch G, Dragomir A, Kalsbeek WD, Luta G, Jordan JM. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 59:1207–13. doi: 10.1002/art.24021
2. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012; 64:1697–707. doi: 10.1002/art.34453
3. Loeser RF. Aging and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2011; 23:492–96. doi: 10.1097/BOR.0b013e3283494005
4. Lotz M, Loeser RF. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone.* 2012; 51:241–48. doi: 10.1016/j.bone.2012.03.023
5. Bhatia-Dey N, Kanherkar RR, Stair SE, Makarev EO, Csoka AB. Cellular Senescence as the Causal Nexus of Aging. *Front Genet.* 2016; 7:13. doi: 10.3389/fgene.2016.00013
6. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013; 153:1194–217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
7. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, Palmer AK, Ikeno Y, Hubbard GB, Lenburg M, O'Hara SP, LaRusso NF, Miller JD, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell.* 2015; 14:644–58. doi: 10.1111/acer.12344
8. Zhai G, Aviv A, Hunter DJ, Hart DJ, Gardner JP, Kimura M, Lu X, Valdes AM, Spector TD. Reduction of leucocyte telomere length in radiographic hand osteoarthritis: a population-based study. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65:1444–48. doi: 10.1136/ard.2006.056903
9. Tamayo M, Mosquera A, Rego JI, Fernández-Sueiro JL, Blanco FJ, Fernández JL. Differing patterns of peripheral blood leukocyte telomere length in rheumatologic diseases. *Mutat Res.* 2010; 683:68–73. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.10.010
10. Sibille KT, Langae T, Burkley B, Gong Y, Glover TL, King C, Riley JL 3rd, Leeuwenburgh C, Staud R, Bradley LA, Fillingim RB. Chronic pain, perceived stress, and cellular aging: an exploratory study. *Mol Pain.* 2012; 8:12. doi: 10.1186/1744-8069-8-12
11. Rahman MM, Kopec JA, Anis AH, Cibere J, Goldsmith CH. Risk of cardiovascular disease in patients with osteoarthritis: a prospective longitudinal study. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013; 65:1951–58. doi: 10.1002/acr.22092
12. Haugen IK, Ramachandran VS, Misra D, Neogi T, Niu J, Yang T, Zhang Y, Felson DT. Hand osteoarthritis in relation to mortality and incidence of cardiovascular disease: data from the Framingham heart study. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74:74–81. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203789
13. Louati K, Vidal C, Berenbaum F, Sellam J. Association between diabetes mellitus and osteoarthritis: systematic literature review and meta-analysis. *RMD Open.* 2015; 1:e000077. doi: 10.1136/rmdopen-2015-000077

14. Huang SW, Wang WT, Chou LC, Liao CD, Liou TH, Lin HW. Osteoarthritis increases the risk of dementia: a nationwide cohort study in Taiwan. *Sci Rep.* 2015; 5:10145. doi: 10.1038/srep10145
15. Castell MV, van der Pas S, Otero A, Siviero P, Dennison E, Denkinger M, Pedersen N, Sanchez-Martinez M, Queipo R, van Schoor N, Zambon S, Edwards M, Peter R, et al. Osteoarthritis and frailty in elderly individuals across six European countries: results from the European Project on OsteoArthritis (EPOSA). *BMC Musculoskelet Disord.* 2015; 16:359. doi: 10.1186/s12891-015-0807-8
16. Barbour KE, Lui LY, Nevitt MC, Murphy LB, Helmick CG, Theis KA, Hochberg MC, Lane NE, Hootman JM, Cauley JA, and Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Hip Osteoarthritis and the Risk of All-Cause and Disease-Specific Mortality in Older Women: A Population-Based Cohort Study. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67:1798–805. doi: 10.1002/art.39113
17. Nüesch E, Dieppe P, Reichenbach S, Williams S, Iff S, Jüni P. All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study. *BMJ.* 2011; 342:d1165. doi: 10.1136/bmj.d1165
18. Kluzek S, Sanchez-Santos MT, Leyland KM, Judge A, Spector TD, Hart D, Cooper C, Newton J, Arden NK. Painful knee but not hand osteoarthritis is an independent predictor of mortality over 23 years follow-up of a population-based cohort of middle-aged women. *Ann Rheum Dis.* 2015.
19. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013; 14:R115. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115
20. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, Bauerschlag DO, Jöckel KH, Erbel R, Mühleisen TW, Zenke M, Brümmendorf TH, Wagner W. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* 2014; 15:R24. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r24
21. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell.* 2013; 49:359–67. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.016
22. Florath I, Butterbach K, Müller H, Bewerunge-Hudler M, Brenner H. Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Hum Mol Genet.* 2014; 23:1186–201. doi: 10.1093/hmg/ddt531
23. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. Epigenetic predictor of age. *PLoS One.* 2011; 6:e14821. doi: 10.1371/journal.pone.0014821
24. Vidal-Bralo L, Lopez-Golan Y, Gonzalez A. Simplified Assay for Epigenetic Age Estimation in Whole Blood of Adults. *Front Genet.* 2016; 7:126. doi: 10.3389/fgene.2016.00126
25. Teschendorff AE, West J, Beck S. Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Hum Mol Genet.* 2013; 22:R7–15. doi: 10.1093/hmg/ddt375
26. Zannas AS, Arloth J, Carrillo-Roa T, Iurato S, Röh S, Ressler KJ, Nemeroff CB, Smith AK, Bradley B, Heim C, Menke A, Lange JF, Brückl T, et al. Lifetime stress accelerates epigenetic aging in an urban, African American cohort: relevance of glucocorticoid signaling. *Genome Biol.* 2015; 16:266. doi: 10.1186/s13059-015-0828-5
27. Horvath S, Erhart W, Brosch M, Ammerpohl O, von Schönfels W, Ahrens M, Heits N, Bell JT, Tsai PC, Spector TD, Deloukas P, Siebert R, Sipsos B, et al. Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111:15538–43. doi: 10.1073/pnas.1412759111
28. Horvath S, Mah V, Lu AT, Woo JS, Choi OW, Jasinska AJ, Riancho JA, Tung S, Coles NS, Braun J, Vinters HV, Coles LS. The cerebellum ages slowly according to the epigenetic clock. *Aging (Albany NY).* 2015; 7:294–306. doi: 10.18632/aging.100742
29. Horvath S, Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Salvioli S, Gentilini D, Di Blasio AM, Giuliani C, Tung S, Vinters HV, Franceschi C. Accelerated epigenetic aging in Down syndrome. *Aging Cell.* 2015; 14:491–95. doi: 10.1111/accel.12325
30. Perna L, Zhang Y, Mons U, Holleczeck B, Saum KU, Brenner H. Epigenetic age acceleration predicts cancer, cardiovascular, and all-cause mortality in a German case cohort. *Clin Epigenetics.* 2016; 8:64. doi: 10.1186/s13148-016-0228-z
31. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Ritchie SJ, Muniz-Terrera G, Harris SE, Gibson J, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Taylor A, Murphy L, et al. The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *Int J Epidemiol.* 2015; 44:1388–96. doi: 10.1093/ije/dyu277
32. Christiansen L, Lenart A, Tan Q, Vaupel JW, Aviv A, McGue M, Christensen K. DNA methylation age is associated with mortality in a longitudinal Danish twin study. *Aging Cell.* 2016; 15:149–54. doi: 10.1111/accel.12421

33. Horvath S, Pirazzini C, Bacalini MG, Gentilini D, Di Blasio AM, Delledonne M, Mari D, Arosio B, Monti D, Passarino G, De Rango F, D'Aquila P, Giuliani C, et al. Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging (Albany NY)*. 2015; 7:1159–70. doi: 10.18632/aging.100861
34. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE, Gibson J, Henders AK, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Murphy L, et al. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol*. 2015; 16:25. doi: 10.1186/s13059-015-0584-6
35. Breitling LP, Saum KU, Perna L, Schöttker B, Holleczeck B, Brenner H. Frailty is associated with the epigenetic clock but not with telomere length in a German cohort. *Clin Epigenetics*. 2016; 8:21. doi: 10.1186/s13148-016-0186-5
36. Reynard L. The aging process and epigenetics: relationship with OA. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015 (Suppl 2); 23:A18–18. doi: 10.1016/j.joca.2015.02.034
37. Wu Y, Chen L, Wang Y, Li W, Lin Y, Yu D, Zhang L, Li F, Pan Z. Overexpression of Sirtuin 6 suppresses cellular senescence and NF- $\kappa$ B mediated inflammatory responses in osteoarthritis development. *Sci Rep*. 2015; 5:17602. doi: 10.1038/srep17602
38. Yudoh K, Karasawa R. Statin prevents chondrocyte aging and degeneration of articular cartilage in osteoarthritis (OA). *Aging (Albany NY)*. 2010; 2:990–98. doi: 10.18632/aging.100213
39. Platas J, Guillén MI, Pérez Del Caz MD, Gomar F, Castejón MA, Mirabet V, Alcaraz MJ. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8:1703–17. doi: 10.18632/aging.101007
40. Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donell ST, Clark IM. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell*. 2002; 1:57–65. doi: 10.1046/j.1474-9728.2002.00008.x
41. Harbo M, Bendix L, Bay-Jensen AC, Graakjaer J, Sjøe K, Andersen TL, Kjaersgaard-Andersen P, Koelvrå S, Delaisse JM. The distribution pattern of critically short telomeres in human osteoarthritic knees. *Arthritis Res Ther*. 2012; 14:R12. doi: 10.1186/ar3687
42. Harbo M, Delaisse JM, Kjaersgaard-Andersen P, Soerensen FB, Koelvrå S, Bendix L. The relationship between ultra-short telomeres, aging of articular cartilage and the development of human hip osteoarthritis. *Mech Ageing Dev*. 2013; 134:367–72. doi: 10.1016/j.mad.2013.07.002
43. Fernández-Tajes J, Soto-Hermida A, Vázquez-Mosquera ME, Cortés-Pereira E, Mosquera A, Fernández-Moreno M, Oreiro N, Fernández-López C, Fernández JL, Rego-Pérez I, Blanco FJ. Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73:668–77. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202783
44. Delgado-Calle J, Fernández AF, Sainz J, Zarrabeitia MT, Sañudo C, García-Renedo R, Pérez-Núñez MI, García-Ibarbia C, Fraga MF, Riancho JA. Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2013; 65:197–205. doi: 10.1002/art.37753
45. Løkk K, Modhukur V, Rajashekar B, Märtens K, Mägi R, Kolde R, Koltšina M, Nilsson TK, Vilo J, Salumets A, Tõnisson N. DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome Biol*. 2014; 15:r54. doi: 10.1186/gb-2014-15-4-r54
46. Aref-Eshghi E, Zhang Y, Liu M, Harper PE, Martin G, Furey A, Green R, Sun G, Rahman P, Zhai G. Genome-wide DNA methylation study of hip and knee cartilage reveals embryonic organ and skeletal system morphogenesis as major pathways involved in osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015; 16:287. doi: 10.1186/s12891-015-0745-5
47. Kaminsky ZA, Assadzadeh A, Flanagan J, Petronis A. Single nucleotide extension technology for quantitative site-specific evaluation of metC/C in GC-rich regions. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33:e95. doi: 10.1093/nar/gni094
48. Altman R, Alarcón G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, Brown C, Cooke TD, Daniel W, Gray R, Greenwald R, Hochberg M, Howell D, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum*. 1990; 33:1601–10. doi: 10.1002/art.1780331101
49. Rodríguez-Lopez J, Pombo-Suarez M, Liz M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Lack of association of a variable number of aspartic acid residues in the asporin gene with osteoarthritis susceptibility: case-control studies in Spanish Caucasians. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8:R55. doi: 10.1186/ar1920
50. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007; 39:175–91. doi: 10.3758/BF03193146