FACULTADE DE MEDICINA
E ODONTOLOXÍA

Traballo de fin de grao.

Análise da relación de TET2 co Alzheimer.

Análisis de la relación de TET2 con el Alzheimer.

Analysis of TET2 and Alzheimer relationship.

Autor: Antonio De Vega Ventura.

Titora: Celia María Pombo Ramos.

Cotitora: Diana Guallar Artal.

Departamentos: Fisioloxia e Bioquímica e Bioloxía Molecular.

(Junio 2021)

Traballo de Fin de Grao presentado na Facultade de Medicina e Odontoloxía da Universidade de Santiago de Compostela para a obtención do Grao en Medicina e Ciruxía.

ÍNDICE

1. RESUMEN. 5
2. PALABRAS CLAVE. 5
3. INTRODUCCIÓN 6
   3.1 Enfermedad de Alzheimer. 6
   3.2 Metiloma, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. 8
      3.2.1 Metiloma y envejecimiento. 8
      3.2.2 Metiloma y enfermedades neurodegenerativas. 10
   3.3 Regulación del metiloma: DNMTs y TETs. 11
      3.3.1 ADN metil-transferasas (DNMTs). 12
      3.3.2 Proteínas ten-eleven traslocation (TETs). 13
   3.4 Enzimas TET: funciones, envejecimiento y enfermedad de Alzheimer. 14
      3.4.1 Función de las enzimas TET durante el desarrollo embrionario temprano. 14
      3.4.2 TETs en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central. 15
      3.4.3 TETs en el envejecimiento. 16
      3.4.4 TETs y la enfermedad de Alzheimer. 17
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS. 18
5. MATERIALES Y MÉTODOS. 19
   5.1 Búsqueda bibliográfica. 19
   5.2 Análisis *in silico* de datos de expresión génica por microarray. 19
6. RESULTADOS. 20
   6.1 Búsqueda bibliográfica: Alzheimer y TET2. 20
   6.2 Análisis *in silico* de la expresión de los enzimas TET en muestras de ARN de cerebros humanos envejecidos. 25
7. DICUSIÓN DE LOS RESULTADOS. 31
8. CONCLUSIONES. 34
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de la demencia en Europa (2018) 6

Figura 2. Evolución y estimación de los casos globales de demencia y sus costes asociados...…….. 8

Figura 3. Evolución del metiloma en relación con el envejecimiento..... 9

Figura 4. Esquema de las dinámicas de deposición y eliminación de grupos metilo en las citosinas del ADN..... 12

Figura 5. Estructura de las enzimas TET 14

Figura 6. Niveles de 5mC, 5hmC, y enzimas implicados en la metilación en el hipocampo de ratones silvestres y modelos murinos de Alzheimer con y sin enriquecimiento ambiental ……..….21

Figura 7. Análisis de colocalización de TET2 con respecto a Iba-1 y placas de amiloide beta en el hipocampo de ratones 5xFAD de 18 meses de edad. Niveles de expression de TET2 en la corteza temporal de 3 sujetos fallecidos con enfermedad de Alzheimer..... 22

Figura 8. Niveles hipocampales de 5hmC, ARN de enzimas TET y de expresión de TET2 en ratones silvestres y 2xTg-AD a las 24 y 67 semanas de vida.. 23

Figura 9. Niveles de placas de amiloide beta, ARN de TET2 y expresión de TET2 en el hipocampo de ratones silvestres y 2xTg-AD de 5,6,9 y 14 meses de vida. 24

Figura 10. Niveles de 5mC y 5hmC en distintas áreas cerebrales de controles y enfermos de Alzheimer……..25

Figura 11. Genes diferencialmente expresados y niveles de expresión de enzimas implicados en la metilación en las muestras de tejido cerebral de enfermos de Alzheimer respecto a los controles…….. 27

Figura 12. Genes diferencialmente expresados y niveles de expresión de enzimas implicados en la metilación en las muestras de corteza temporal de enfermos de Alzheimer respecto a los controles……. 28

Figura 13. Genes diferencialmente expresados y niveles de expresión de enzimas implicados en la metilación en las muestras de hipocampo de enfermos de Alzheimer respecto a los controles ……...……29

Figura 14. Genes diferencialmente expresados y niveles de expresión de enzimas implicados en la metilación en las muestras de corteza frontal de enfermos de Alzheimer respecto a los controles……. 30

Figura 15. Diferencias por localización anatómica en los niveles de expresión de TET2 en enfermos de Alzheimer con respecto a controles. 31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Expresión diferencial de los genes a estudio en muestras cerebrales de sujetos afectados por la enfermedad de Alzheimer con respecto a los controles.. 27

Tabla 2. Expresión diferencial de los genes a estudio en muestras de corteza temporal en sujetos afectados por la enfermedad de Alzheimer con respecto a los controles.. 28

Tabla 3. Expresión diferencial de los genes a estudio en muestras de hipocampo en sujetos afectados por la enfermedad de Alzheimer con respecto a los controles.. 29

Tabla 4. Expresión diferencial de los genes a estudio en muestras de corteza frontal en sujetos afectados por la enfermedad de Alzheimer con respecto a los controles.. 30

1. RESUMEN.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia y se prevé que, tanto su prevalencia como su impacto en la sociedad, aumentarán en las próximas décadas. Uno de los múltiples mecanismos alterados durante el transcurso de esta enfermedad es el patrón de metilación del ADN. En la regulación de dicho patrón de metilación intervienen diversas enzimas entre las que destacan dos familias, las ADN metil-transferasas (DNMTs) y las proteínas Ten-Eleven-Traslocation (TET). Las proteínas TET también poseen un papel relevante en el correcto desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central (SNC) por lo que centraremos nuestro trabajo sobre ellas, con un enfoque centrado en TET2. La actividad de TET2 se ha correlacionado positivamente con la supervivencia neuronal y su déficit se ha observado en el hipocampo de ratones envejecidos, siendo este déficit aún mayor en modelos murinos de la EA. El hipocampo es, junto con el bulbo olfatorio, la única área cerebral con capacidad de neurogénesis, la de mayor relación con los procesos de memoria y aprendizaje y la que más tempranamente se afecta en la EA. Se ha podido observar que la restitución de los niveles de expresión de TET2 en el hipocampo de modelos murinos restituyen la neurogénesis y mejoran la cognición. Para conocer más sobre el posible rol de TET2 y el resto de los enzimas implicados en la metilación en la EA, analizamos sus niveles de expresión diferencial en muestras cerebrales de humanos fallecidos con EA con respecto a controles. Encontramos un descenso generalizado en los niveles de TET2 en los diferentes tejidos cerebrales estudiados siendo este descenso mayor en el hipocampo aunque sin llegar alcanzar la significación estadística. Ante estos resultados consideramos que todavía queda mucho por conocer sobre el rol que puede jugar TET2 en la EA y otras enfermedades neurodegenerativas.

2. PALABRAS CLAVE.

Alzheimer, envejecimiento, ADN, metiloma, DNMTs, TETs, TET2, 5mC, 5hmC, hipocampo.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que representa la primera causa de demencia a nivel mundial provocando entre el 60 y el 80% de todas las demencias. Su prevalencia aumenta con la edad, desde un 3% en la población de entre 65 y 74 años, hasta un 40% en la población mayor de 90 años (Gaugler et al. 2020; Alzheimer Europe 2019) (Figura 1).

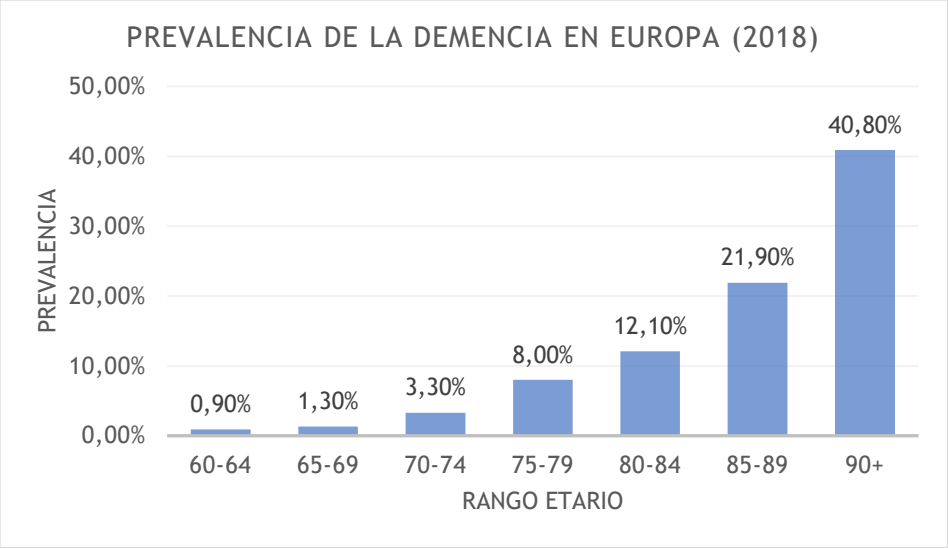

Figura 1. Prevalencia de la demencia en Europa (2018). Fuentes: Alzheimer Europe y Dementia in Europe Yearbook 2019.

La etiología del Alzheimer todavía no está bien definida. La mayoría de los casos son esporádicos siendo la edad el principal factor de riesgo en contraposición a mutaciones genéticas específicas que sólo son responsables del 1% al 5% de los casos (Amosa et al. 2018). Se conocen múltiples genes que influyen en el inicio y progresión de la enfermedad. Mutaciones en los genes que codifican para la proteína precursora del amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1), presenilina 2 (PSEN2) y la apolipoproteína E (APOE), entre otros, pueden conducir a formas autosómicas dominantes, de habitual inicio en menores de 65 años, o aumentar el riesgo de padecer la enfermedad (Amosa et al. 2018). Existen múltiples estudios sobre la relación de otros factores etiológicos con la enfermedad de Alzheimer que todavía no han establecido una conexión causal definitiva (Huang 2018).

A nivel fisiopatológico destacan dos entidades: las placas extracelulares de amiloide beta y los ovillos neurofibrilares intracelulares de proteína tau hiperfosforilada, alteraciones que conducen a la desestructuración de las sinapsis y a la muerte neuronal, provocando atrofia generalizada de la masa encefálica en pacientes de larga evolución pero que comienza en estadios precoces en el hipocampo y el lóbulo temporal medial (Huang 2018; Barkhof et al.

2012). Las placas de amiloide beta proceden del procesamiento de la proteína precursora del amiloide, una proteína transmembrana que interviene en el crecimiento y reparación de las neuronas. La degradación de la proteína precursora del amiloide es llevada a cabo por la familia de enzimas de las secretasas, generando diferentes fragmentos de longitud entre 38 y 43 aminoácidos. Mutaciones en los genes citados anteriormente, APP, PSEN1 o PSEN2 provocan un aumento en la isoforma del amiloide beta de 42 aminoácidos (Aβ42) que por su menor solubilidad tiene tendencia a agregarse formando las conocidas placas de amiloide beta (Mann et al. 1996). La acumulación de estas placas también puede surgir de la incapacidad del organismo para catabolizarlas, siendo las apolipoproteínas E las principales encargadas de este proceso. El polimorfismo APOE4, de menor actividad catabólica que el resto, contribuye hasta en un 50% de las formas esporádicas de la enfermedad de Alzheimer (Masters et al. 2015).

Los ovillos neurofibrilares de proteína Tau hiperfosforilada son una manifestación patológica común a múltiples enfermedades neurodegenerativas. La proteína Tau regula la estabilidad y el trasporte axonal de las neuronas entre otras funciones. En cuanto a su estructura nativa, es decir, la más estable, Tau está considerada como una proteína intrínsicamente desordenada, siendo esta una característica típica de proteínas que requieren rápidos cambios conformacionales para llevar a cabo sus funciones (Kovacech et al. 2010). Como contrapartida estas proteínas tienen una alta propensión a plegarse de forma anómala, en conformación de lámina beta que favorece la formación de los ovillos neurofibrilares, implicados en la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas conocidas como taupatías, entre las que destacan la demencia frontotemporal, la enfermedad de Pick y la parálisis supranuclear progresiva (Silva et al. 2020). La mayoría de estas taupatías no se producen por mutaciones en el gen que codifica la proteína Tau sino que ocurren por la alteración conformacional de dicha proteína por la actividad de otros elementos como fosfatasas, acetilasas o chaperonas (Martin et al. 2011).Con respecto a la enfermedad de Alzheimer, se cree que el acúmulo de las placas de amiloide beta y el estado de neuroinflamación que éstas producen favorece la formación de los ovillos neurofibrilares pero los mecanismos moleculares que llevan a la agregación de Tau, a la desestructuración axonal y a la muerte neuronal todavía no son conocidos con exactitud (Silva et al. 2020). Éstas y otras alteraciones pueden ser detectadas años antes del inicio de la demencia, durante la fase preclínica del Alzheimer, mediante diversas técnicas diagnósticas destacando la tomografía por emisión de positrones, capaz de medir los niveles de amiloide beta y el metabolismo de la glucosa y el análisis bioquímico del líquido cefalorraquídeo, en busca de niveles alterados tanto de amiloide beta como de Tau. Esta capacidad para el diagnóstico precoz ha estimulado a la comunidad científica para intentar descubrir un tratamiento que pueda parar o al menos enlentecer el progreso de esta patología (Gaugler et al. 2020). Sin embargo, en la actualidad si el paciente no tiene claros antecedentes familiares, lo habitual es que el diagnóstico se produzca en la fase clínica de la enfermedad, cuando ya muestra signos y síntomas de deterioro cognitivo (Huang 2018).

Una de las pruebas complementarias que se realizan para intentar llegar a un diagnóstico en el paciente con deterioro cognitivo son las técnicas de neuroimagen como la resonancia magnética. En ella se pueden apreciar diferentes grados de atrofia cerebral, pero característicamente una de las primeras áreas afectadas es el hipocampo, región especialmente relacionada con la memoria. Otras regiones particularmente afectadas en la enfermedad de Alzheimer son los lóbulos temporal medial y parietal. (Barkhof et al. 2012). También es

importante destacar que estas alteraciones (placas de amiloide beta, ovillos neurofibrilares y atrofia cerebral) pueden encontrarse en las autopsias de individuos sin enfermedad de Alzheimer ni otros síntomas de demencia (Gaugler et al. 2020).

Ante este panorama, el de una enfermedad muy incapacitante, con una incidencia cada vez mayor, de gran impacto tanto social como económico, sin una etiología ni fisiopatología claramente definidas y sin tratamientos eficaces cabe explorar todos aquellos aspectos de la biología que puedan aportar luz sobre una de las mayores prioridades en salud pública para la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization 2017; Alzheimer Europe 2019) (Figura 2).

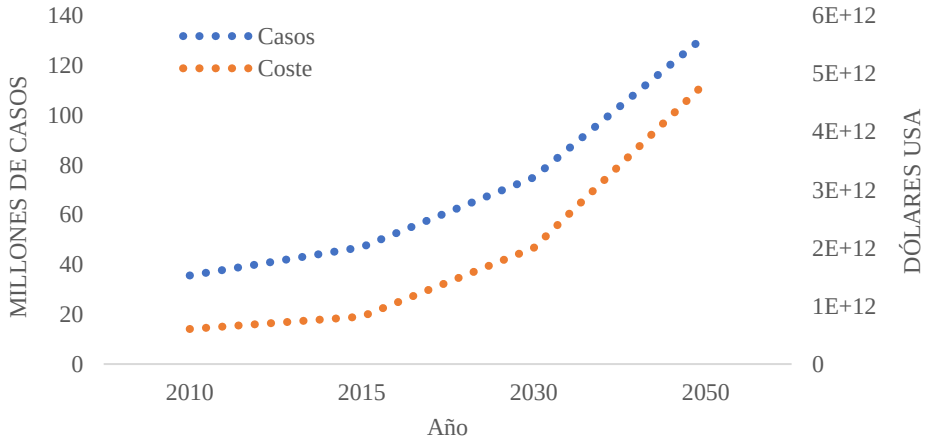

Figura 2.Evolución y estimación de los casos globales de demencia y sus costes asociados. Fuentes: Organización Mundial de la Salud 2017 y Alzheimer's association Facts and Figures 2020.

3.2 METILOMA, ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

3.2.1 Metiloma y envejecimiento.

La modificación química de las citosinas en el ADN es uno de los principales mecanismos de regulación epigenética. Este mecanismo influye en la expresión del genoma sin alterar la secuencia de bases del ADN (Goldberg et al 2007). En particular, la unión de un grupo metilo (-CH3) en el carbono 5' del anillo pirimidínico de la base citosina genera la denominada quinta base, la 5-metilcitosina (5mC) (Hotchkiss 1948). La metilación de las citosinas a 5mC es la principal forma de modificación epigenética del ADN en mamíferos. Gran parte de la metilación del ADN ocurre en las citosinas de las secuencias ricas en dinucleótidos CpG (Goldberg et al. 2007). Esta metilación del genoma es necesaria para la regulación de la transcripción génica, la estabilidad genómica y la expresión diferencial de alelos maternos y paternos conocida como impronta genética cuyo correcto funcionamiento es imprescindible para el desarrollo embrionario y para definir cada identidad celular (Holliday y Pugh, 1975; Bird 2002). Alternativamente a las secuencias ricas en CpG metiladas existen unas regiones del genoma con una alta densidad de CpG habitualmente sin metilar que se denominan islas CpG

(Bird et al. 1985). En estas islas CpG se encuentran muchos de los promotores de genes altamente expresados (Schübeler, 2015). Cabe destacar que la metilación del genoma es reversible, lo que dinamiza los procesos reguladores en los que participa. Para ello, se conjuga una acción altamente regulada de enzimas que depositan los grupos metilo en las citosinas (ADN metiltransferasas), y enzimas que lo eliminan mediante su oxidación (hidroximetiltransferasas) (Jung y Pfeifer 2015).

A pesar de la existencia de estudios sobre la metilación del ADN en diferentes tejidos humanos que han demostrado la existencia de patrones comunes y también específicos de tejido (Varley et al 2013; Schultz et al 2017), sabemos que los patrones de metilación del ADN no son estables sino que varían a lo largo de la vida de un individuo. Las células de mamíferos jóvenes muestran un patrón más homogéneo y una mayor metilación global del genoma, mientras que las células de individuos envejecidos muestran una hipometilación global acompañada de hipermetilación en loci específicos (Heyn et al 2012; Rakyan et al 2010; Goldberg et al 2007; Moore et al. 2013). Con escasas excepciones, el envejecimiento en mamíferos se asocia con: la hipometilación de CpG en las denominadas secuencias repetitivas (antiguamente conocido como ADN basura), que contienen elementos transponibles y de origen viral que constituyen hasta dos tercios del genoma de los mamíferos (Jintaridth et al. 2010; Heyn et al 2012; Pal y Tyler. 2016, Koning et al 2011; Schulz et al, 2006). Esta pérdida de la metilación de los elementos repetitivos aumenta el riesgo de expresión de elementos transponibles que pueden menoscabar la integridad del ADN y aumentar la inestabilidad genómica, uno de los marcadores característicos del envejecimiento. (Pal y Tyler. 2016; López-Otín et al. 2013) (Figura 3).

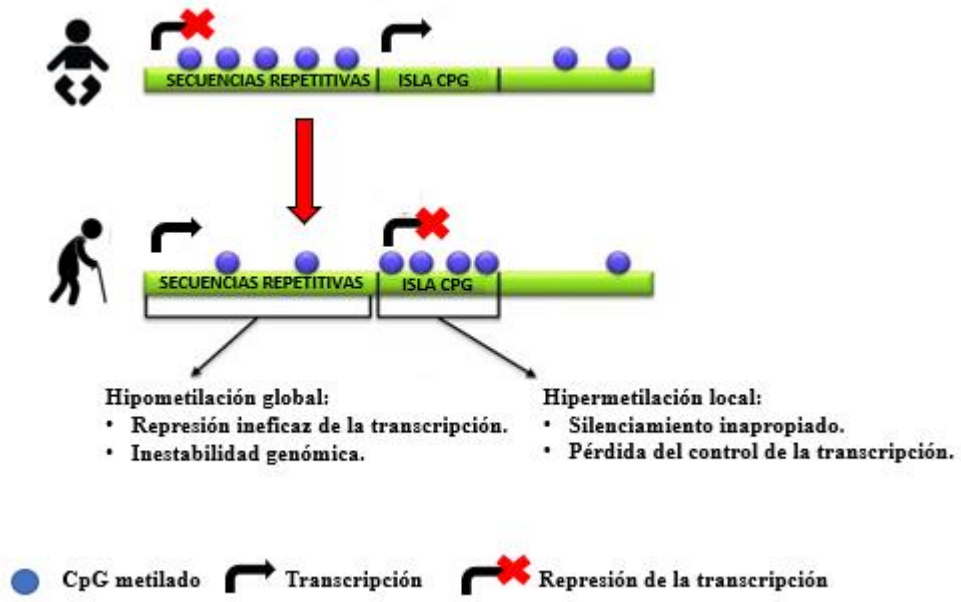

Figura 3.Evolución del metiloma en relación con el envejecimiento. Modificado de: Pal y Tyler Sci. Adv. 2016 y Johnson et al. Rejuvenation Res. 2012.

Esta hipometilación del ADN implica que existe un cambio en las dinámicas de metiltransferasas e hidroximetilasas durante el envejecimiento, de forma que el balance final

de citosinas metiladas se ve alterado. En particular, esta hipometilación podría atribuirse a dos factores: (1) un aumento de la actividad de las enzimas encargadas de eliminar 5mC (proteínas TET1/2/3) (Wu y Zhang 2019) o bien (2) al descenso en la actividad de las enzimas DNA metiltransferasas (proteínas DNMT1,3), encargadas de metilar las citosinas (Heyn et al 2012; Jung y Pfeifer 2015) (Figura 4). Sobre el papel de estas enzimas entraremos en mayor profundidad en el siguiente punto de este trabajo.

En relación con el metiloma y el envejecimiento, múltiples estudios han relacionado ambos conceptos (Issa et al. 1994; Ahuja et al. 1998; Fraga y Esteller 2007). Algunos de estos cambios en el metiloma relacionados con el envejecimiento son relativamente constantes entre individuos, lo que ha permitido desarrollar los llamados "relojes de metilación del ADN", unos algoritmos de elevada precisión (con un coeficiente de correlación mayor de 0.9) que permiten predecir la edad de un sujeto con un margen de error medio menor de 5 años a partir del análisis de los patrones de metilación de una centena de loci (Field et al. 2018; Horvath 2013; Hannum et al 2013, Weidner et al. 2014). Estos relojes epigenéticos han demostrado que la hipometilación de ciertos CpGs es más indicativa de envejecimiento biológico y tiene mayor impacto en la esperanza de vida que las zonas hipermetiladas (Zhang et al. 2017, Bell et al. 2019). Además, existen evidencias que sugieren que la mayoría de los cambios en el patrón de metilación ocurren de una manera programada en subpoblaciones celulares de los tejidos durante el envejecimiento natural, predisponiéndolos a la tumorogénesis (Klustein et al. 2016). Estos sorprendentes descubrimientos han abierto la puerta a una nueva línea de investigación que pretende estudiar el impacto que tienen los factores estresantes tanto endógenos como exógenos sobre el epigenoma y la salud, y no solo eso, ya que también abre la posibilidad de revertir dichos cambios epigenéticos relacionados con el envejecimiento a través de intervenciones farmacológicas (Horvath y Raj 2018; Fahy et al 2019). En este contexto ya se han realizado ensayos clínicos que han demostrado la capacidad de ciertas intervenciones farmacológicas para producir un rejuvenecimiento a nivel epigenético. Si bien el envejecimiento es un conjunto de procesos complejo y el modelo de los relojes epigenéticos simplemente una aproximación matemática, este modelo es la forma más precisa de medir la edad biológica y el riesgo de enfermedad relacionada con la edad (Fahy et al. 2019), por lo que la posibilidad de actuar sobre él con la intención de prevenir las enfermedades ligadas al envejecimiento es un campo de gran interés.

3.2.2 Metiloma y enfermedades neurodegenerativas.

Cuando los mecanismos que establecen y reconocen el patrón de metilación del ADN no funcionan correctamente suelen aparecen problemas cognitivos tanto de aprendizaje como de memoria, un ejemplo es el síndrome de Rett, una enfermedad pediátrica neurodegenerativa que se produce en torno a los seis meses de vida por una mutación de una proteína de unión al grupo metilo de la 5mC, provocando la regresión de los hitos del desarrollo alcanzados hasta la fecha, enlentecimiento del crecimiento cerebral, convulsiones, dificultad para la deambulación y discapacidad intelectual (Moore et al. 2013; Sulkes 2018). Otro ejemplo de enfermedad neurodegenerativa producida por alteraciones en los mecanismos de metilación del ADN, es la variedad de la neuropatía hereditaria sensitivo-autonómica tipo 1 (conocida como HSAN1E (hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1E) producida por la mutación en el gen de

la ADN metiltransferasa 1 (DNMT1), que produce un cuadro clínico de mayor gravedad dentro del espectro de estas enfermedades, ya que además de la característica debilidad y atrofia de predominio distal de inicio en torno a los 20-30 años, provoca pérdida auditiva y demencia acortando la esperanza de vida media hasta los 50 años (Klein 2013 y 2017). Mutaciones en este mismo gen también se han relacionado con la enfermedad de Alzheimer familiar de inicio tardío (Klein et al. 2013). La lista de enfermedades neurológicas relacionadas con alteraciones en el patrón de metilación también incluye, entre otras, el síndrome de X frágil, causado por una expansión del trinucleótido CGG, acompañada de una metilación anormal de dicha expansión, y los síndromes por alteración de la impronta genética Prader-Willi y Angelman, todos ellos responsables de discapacidad intelectual (Moore et al. 2013). Con respecto a la enfermedad de Alzheimer también ha sido relacionada con un patrón aberrante de metilación del genoma (Chouliaras et al 2010; Johnson et al. 2012) e incluso se ha llegado a correlacionar la aceleración del envejecimiento epigenético del cerebro con el deterioro cognitivo, la carga de amiloide beta y la producción de placas por agregación de la proteína amiloide (Chouliaras et al 2013). Ante esta perspectiva se ha sugerido utilizar los relojes epigenéticos como biomarcadores de la edad cerebral (Levine et al. 2015), y por lo que hemos visto esto implica la posibilidad de actuar farmacológicamente sobre dichas modificaciones epigenéticas lo que supondría una nueva línea de tratamiento en la enfermedad de Alzheimer.

3.3 REGULACIÓN DEL METILOMA: DNMTS Y TETS.

Como hemos visto en el apartado anterior, el estado de metilación del genoma es de vital importancia a nivel celular, tisular y sistémico ya que se encarga de la regulación del genoma, incluyendo la regulación de la transcripción. Por ello, se hace necesario conocer a los sistemas responsables de los procesos de metilación y desmetilación, es decir, las enzimas DNMTs (ADN metil-transferasas) y TETs (ten-eleven traslocation). La familia de enzimas ADN metil-transferasas (DNMTs) es la que añade el grupo metilo (-CH3) a las citosinas y con ello da lugar a la 5-metilcitosina (5mC) (Yen et al. 1992). Este grupo metilo puede ser retirado por las enzimas TET (ten-eleven traslocation) mediante oxidaciones sucesivas (Tahiliani et al. 2009), lo que lleva en último término a su eliminación de forma pasiva tras la replicación celular, o a su eliminación activa a través de mecanismos de reparación del ADN (REB) (Figura 4).

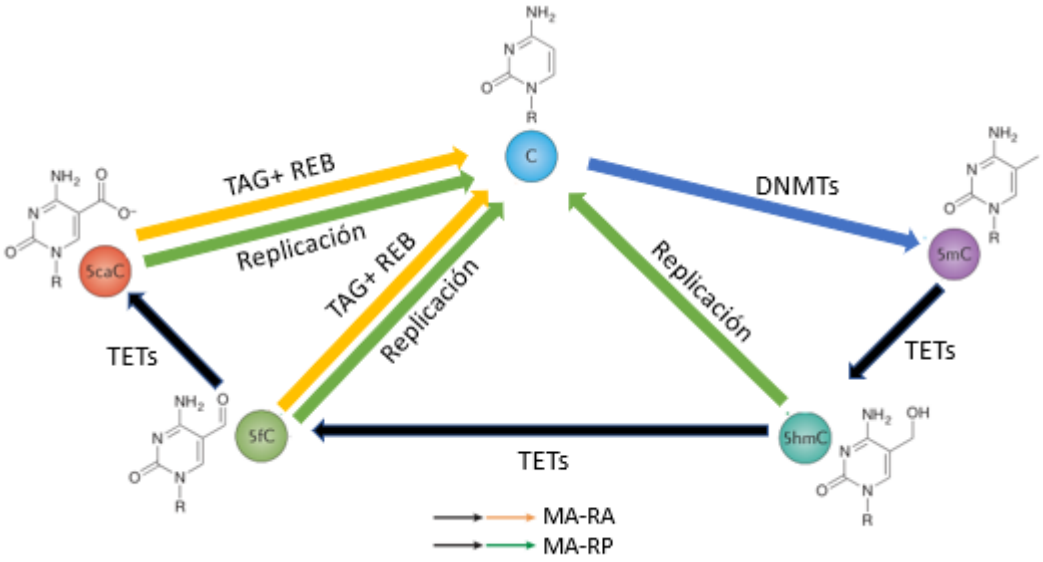

Figura 4.Esquema de las dinámicas de deposición y eliminación de grupos metilo en las citosinas del ADN. DNMTs: ADN metiltransferasas. TAG: Timina ADN Glicosilasa. REB: Reparación por Escisión de Base. MA: Modificación activa. RA: Retirada activa. RP: Retirada Pasiva. 5mC: 5-metilcitosina, 5hmC: 5-hidroximetilcitosina, 5fC: 5-formilciosina, 5caC: 5-carboxilcitosina. Modificado de Wu X. Nat Rev Genet. 2017.

3.3.1 ADN metil-transferasas (DNMTs).

La familia de enzimas DNMTs está compuesta por cuatro miembros capaces de metilar ADN: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L. De DNMT3L apenas hablaremos puesto que se expresa principalmente durante el desarrollo temprano, en las células germinales y en el timo en adultos y no tiene actividad catalítica demostrada (Aapola et al. 2000, Moore et al. 2013). Con respecto a DNMT1, DNMT3A y DNMT3B, todas poseen una estructura similar pero tienen funciones y patrones de expresión distintos (Yen et al. 1992; Xie et al 1999). DNMT1 se expresa ubicuamente, y es conocida como la DNMT de mantenimiento ya que se encarga de copiar el patrón de metilación del ADN en las hebras de ADN recién sintetizadas tras la replicación (Hermann et al. 2004) y también de metilar el ADN tras los procesos de reparación (Mortusewicz et al. 2015). Otra función de DNMT1 es su papel de vital importancia en los procesos de diferenciación y división celular. Tanto en embriones de ratón en desarrollo (Li et al. 1992) como en cultivos de fibroblastos in vitro (Jackson-Grusby et al. 2001) una ausencia total de DNMT1 provoca la muerte tanto del embrión (Moore et al. 2013). Sin embargo la ausencia de DNMT1 en células madre embrionarias de ratón no afecta a su viabilidad, aunque sí a su diferenciación (Chen et al, 1998) (Moore et al. 2013). Por otro lado, DNMT3A y DNMT3B se conocen como las metilasas de novo ya que no tienen preferencia como DNMT1 por el ADN hemimetilado y pueden introducir grupos metilo en el ADN sin metilar o “desnudo”. Su principal diferencia es su patrón de expresión: mientras DNMT3A actúa de forma relativamente ubicua, DNMT3B no se expresa o lo hace a muy bajos niveles en la mayoría de los tejidos somáticos con las excepciones de testículos, tiroides y médula ósea (Xie et al. 1999). De forma similar a DNMT1, DNMT3B es de vital importancia durante el desarrollo embrionario y DNMT3A lo es para una normal diferenciación celular (Okano et al 1999).

A medida que envejecemos se reduce la actividad de DNMT1 (Casillas et al. 2003; Lopatina et al. 2002). Esta reducción está en línea con la hipometilación global que se observa en los organismos envejecidos. Estudios realizados en modelos murinos con un único alelo funcionante de DNMT1 (Dnmt1+/−) mostraron en animales adultos dificultades para el aprendizaje y alteraciones en la memoria que venían acompañados de menores niveles de metilación del ADN (Liu et al. 2011). Una de las posibles explicaciones para el descenso de DNMT1 con el envejecimiento puede ser su dependencia de la hormona de crecimiento (Armstrong et al. 2014) que comienza un paulatino descenso desde el final de la maduración física y sexual de aproximadamente 15% por cada 10 años de vida adulta (Jung y Pfeifer 2015; García et al. 2019). En particular, la hormona de crecimiento regula la disponibilidad del cofactor SAM, necesario para la actividad metiltransferasa, interfiriendo de esta forma en los niveles de 5mC en el ADN. Con respecto a los focos de hipermetilación que también ocurren durante el envejecimiento se han postulado diversas teorías. Algunas contemplan el reclutamiento de las DNMTs de novo, DNMT3A y DNMT3B, por el complejo Polycomb, un grupo de proteínas que ayudan a mantener los patrones de expresión génica celulares (Cedar y Bergman 2012), mientras que otras plantean la pérdida de dichos complejos Polycomb con el envejecimiento lo que permitiría el acceso a las DNMTs de novo (Jung y Pfeifer 2015).

3.3.2 Proteínas ten-eleven traslocation (TETs).

Otro mecanismo que potencialmente puede contribuir a la hipometilación del genoma asociada al envejecimiento es la actividad de las enzimas ten-eleven traslocation (TET), aunque en la actualidad su rol en este proceso no está claramente definido (Tan y Shi 2012). Las enzimas TET; TET1, TET2 y TET3, pertenecen al grupo de dioxigenasas dependientes de alfa-cetoglutarato y hierro II que participan en el proceso de desmetilación del nucleótido 5-metil-citosina (5mC) en el ADN mediante oxidaciones iterativas que dan lugar a las moléculas intermediarias en el proceso de desmetilación conocidas como 5-hidroximetilcitosina (5hmC) (Tahiliani et al. 2009; Ito et al. 2010), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC) (Ito et al. 2011) (Figura 4). Estructuralmente las proteínas TET contienen un dominio de doble hélice beta con actividad dioxigenasa (DSBH) que a su vez contiene una región espaciadora de función desconocida y lugares de unión para los cofactores hierro II [Fe (II)] y 2-oxoglutarato (2-OG) y un dominio rico en cisteína que también posee actividad dioxigenasa. Todos estos elementos juntos forman la región catalítica próxima al extremo carboxilo terminal (Figura 5). TET1 y TET3 contienen además, colindante al extremo amino-terminal, un dominio CXXC que se puede unir directamente a las islas CpG del ADN (Zhang et al 2010, Rasmussen y Helin 2016) (Figura 5).

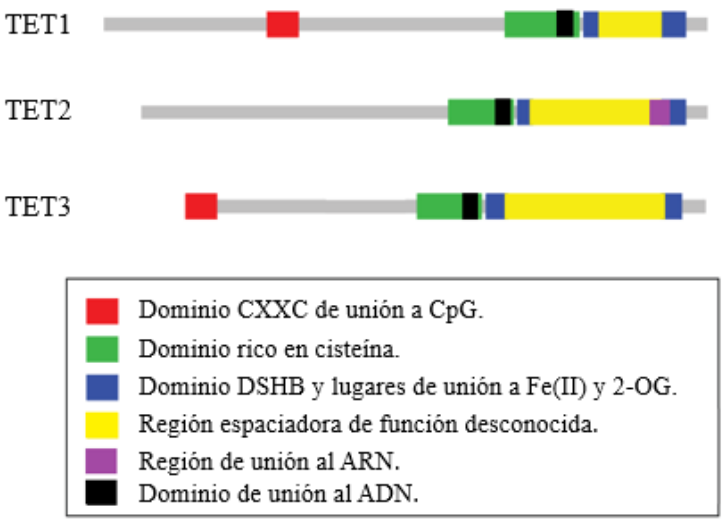

Figura 5.Estructura de las enzimas TET. Modificado de Tan L y Shi YG, Development 2012 y de Garcia-Outeiral et al. Front Cell Dev Biol. 2021

TET2, la enzima sobre la que nos centraremos en este trabajo no posee dicho dominio CXXC de unión al DNA, pero sí tiene un dominio de unión al ADN en una muesca formada por dos bucles que se encuentran próximos al dominio DSHB (Hu et al. 2013). Además de su conocida función en ADN, más recientemente se ha descrito que las enzimas TET pueden también llevar a cabo la oxidación de 5mC en el ARN (Fu et al. 2014), gracias en parte a su dominio de unión al ARN, contiguo al extremo carboxilo terminal (He et al. 2016; Guallar et al. 2018; Lan et al Nat Commun 2020).

3.4 ENZIMAS TET: FUNCIONES, ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Las enzimas TET juegan un papel importante en múltiples procesos biológicos y patológicos entre los que destacan: el desarrollo embrionario temprano, la diferenciación celular en periodos precoces del desarrollo, el correcto desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, el cáncer y la generación de células madre pluripotentes inducidas. Como el rol de las distintas enzimas TET difiere en estos procesos, los abordaremos separadamente.

3.4.1 Función de las enzimas TET durante el desarrollo embrionario temprano.

Tanto en los embriones de ratón como humanos tras la formación del zigoto por la unión del espermatozoide y el óvulo se lleva a cabo un proceso de desmetilación activa por el enzima TET3 que afecta en mayor medida al genoma paterno que al materno (Zhu et al. 2018). Los niveles de metilación en humanos descienden drásticamente hasta el 5º-6º día posfecundación (Fulka et al. 2004). En este momento del desarrollo se ha generado el blastocisto, una estructura en la que se pueden diferenciar dos subgrupos celulares, la masa celular interna con capacidad para generar todos los tejidos del embrión y el trofoblasto que generará los tejidos extraembrionarios, la placenta y las membranas. En este momento de la embriogénesis

temprana TET1 y TET2 alcanzan elevados niveles de expresión en la masa celular interna (MCI) (Tang et al. 2010). A partir de este momento se produce la metilación de novo en el genoma por diversas DNMTs. Una vez que el embrión se ha implantado, un grupo de células sufrirá dos oleadas de desmetilación y dará lugar a las células germinales primordiales, precursoras de los gametos. En este proceso de desmetilación se encuentran implicados TET1 y TET2 (Greenberg y Bourc'his 2019). Recordemos que 5hmC no es solo el primer intermediario generado en la desmetilación de 5mC por las enzimas TET, sino que también es el más abundante en el genoma (Ito et al. 2011) ya que las enzimas TET muestran menor reactividad de oxidación de 5hmC que de 5mC (Hu et al. 2015). Se observa una disminución de 5hmC durante el desarrollo embrionario, así como tras la diferenciación de células madre embrionarias (derivadas de la MCI), lo que sugiere un papel de 5hmC en el proceso de diferenciación celular (Ficz et al. 2011; Cheng et al. 2015).

3.4.2 TETs en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central.

Los niveles de 5hmC en el cerebro aumentan durante el desarrollo embrionario, e incluso durante el desarrollo postnatal, del sistema nervioso (Szulwach et al. 2011, Mellen et al. 2012) y permanecen elevados en la vida adulta con respecto a otros tejidos (Munzel et al. 2010; Kriaucionis y Heintz 2009). Esto que sugiere un rol de 5hmC como de las enzimas TET en la correcta formación y mantenimiento del sistema nervioso central. Mediante ensayos de silenciamiento de las distintas proteínas TET, se han realizado diversos descubrimientos sobre su papel en el sistema nervioso central. En cuanto a TET1, su déficit en ratones adultos impide una correcta neurogénesis hipocampal y provoca alteraciones del aprendizaje, de la memoria y de plasticidad de las sinapsis (Zhang et al. 2013; Rudenko et al. 2013). El déficit de TET1 también provoca que diversos genes normalmente transcritos por la actividad de las neuronas hipocampales lo hagan en menor medida por hipermetilación de sus promotores (Rudenko et al. 2013). Por otra parte, los niveles de TET3 en las anteriormente citadas neuronas hipocampales pueden mostrar cambios bidireccionales en función de su actividad sináptica, que a su vez modulan la función y plasticidad neuronales (Yu et al. 2015). La depleción conjunta de TET1 y TET3 provoca defectos en la arborización dendrítica en el cerebelo de modelos murinos (Zhu et al. 2016). Con respecto a TET2, se conoce que su actividad en el sistema nervioso central se correlaciona positivamente con la supervivencia neuronal (Mi et al. 2015). Recientemente se ha relacionado el déficit del enzima TET2 en el hipocampo de ratones con el proceso normal de envejecimiento y con alteraciones en los procesos de neurogénesis y cognición (Gontier et al. 2018). También se ha demostrado que al restablecer la expresión de TET2 en el hipocampo de dichos ratones viejos estos recuperan la neurogénesis y mejoran cognitivamente. (Gontier et al. 2018). A pesar de estas aseveraciones, la interpretación de dichos datos debe llevarse a cabo con cautela puesto que algunos de los efectos observados pueden deberse a funciones de TET no relacionadas con su actividad catalítica o bien deberse a alteraciones provocadas durante el desarrollo y no a disfunción de neuronas maduras (Wu y Zhang 2017).

3.4.3 TETs en el envejecimiento.

Ya hemos comentado en el apartado 2 de este trabajo la correlación entre el envejecimiento y los cambios en el metiloma. Recordemos que en los que en mamíferos jóvenes se puede observar un patrón más homogéneo y una mayor metilación global del genoma que en las células de mamíferos envejecidos que muestran una hipometilación global acompañada de hipermetilación en loci específicos. Dicha hipometilación puede ser consecuencia de una mayor actividad de las enzimas TET o bien a una mayor función de las enzimas DNMTs (López-Moyado et al. 2019). Pero en términos biológicos el envejecimiento va mucho más allá de cambios en el metiloma y puede definirse como el deterioro dependiente del paso del tiempo de las funciones fisiológicas necesarias para la supervivencia y la fertilidad del individuo (Gilbert 2000). Este deterioro es el principal factor de riesgo para sufrir múltiples enfermedades. La investigación sobre el envejecimiento ha descrito nueve hitos comunes a múltiples organismos: la inestabilidad genómica, el desgaste de los telómeros, diferentes alteraciones epigenéticas, la pérdida de la proteostasis, la desregulación de la percepción respecto a los nutrientes, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de las células madre y la alteración de la comunicación intercelular (López-Otín et al. 2013). Anteriormente ya hemos remarcado como una alteración epigenética como lo es la alteración del metiloma puede afectar a la inestabilidad genómica. A continuación veremos ejemplos de alteraciones en el metiloma en los que se ha objetivado una disfunción de los enzimas TET y que afectan a otros de estos hitos.

Uno de los hitos en relación con el envejecimiento es el de senescencia (Hayflick y Moorhead, 1961) que aplicado a las células implica el cese irreversible del ciclo celular, proceso en el cual las células dejan de dividirse y en el que puede observarse alteraciones fenotípicas distintivas. La senescencia protege contra enfermedades como el cáncer al impedir que células con daño en el ADN se repliquen sin restricciones (Serrano et al. 1997; Bodnar et al. 1998) pero también interviene en múltiples procesos como el desarrollo y la reparación tisular. Cuando el organismo no es capaz de deshacerse de esas células senescentes, éstas generan un ambiente proinflamatorio que contribuye al envejecimiento y a sus enfermedades asociadas como las cardiovasculares, las neurodegenerativas y el cáncer (van Deursen 2014). Experimentalmente han sido identificadas en el ADN regiones diferencialmente metiladas que se asocian a la senescencia y se correlacionan con el envejecimiento de forma similar aunque más débilmente que los relojes de metilación que hemos citado anteriormente (Lowe et al. 2015). Con respecto a las enzimas TET y la senescencia, se han relacionado niveles elevados de expresión de TET1 con la resistencia a la senescencia de ciertas células tumorales por lo que su inactivación se plantea como una vía más en el tratamiento de estos tumores (Kondo 2019). Otra de las características del envejecimiento es el del agotamiento de las células madre. Un experimento en ratones a los que se les inactivó TET1 ha demostrado una conexión entre dicha inactivación y el agotamiento de las células madre, concretamente de las células madre germinales afectando la capacidad reproductiva de los ratones (Huang et al. 2020). El mismo estudio demostró que en las células germinales deficientes en TET1 se produce un acortamiento de los telómeros que se puede correlacionar con la inestabilidad genética (Masser y DePinho 2002). También podemos observar alteraciones en la expresión de los enzimas TET en relación con el envejecimiento más allá de las que afectan a los hitos anteriormente citados. Un estudio sobre

células sanguíneas mononucleares y linfocitos T de donantes estratificados por edad ha demostrado un descenso en la expresión génica de TET1, TET3 y TDG así como un descenso en los niveles de 5hmC y aumento de los niveles de 5caC en los donantes de mayor edad (Truong et al. 2015; Valentini et al. 2016).

A pesar de estas observaciones y su correlación con el envejecimiento todavía falta mucho por descubrir sobre el rol de los enzimas TET, incluyendo si los niveles de 5hmC o de los enzimas TET contribuyen al envejecimiento o son resultado del proceso de envejecer (Huang et al. 2020).

3.4.4 TETs y la enfermedad de Alzheimer.

Los niveles de 5hmC aumentan en el cerebro en relación con la edad tanto en la sustancia gris como en la blanca (Szulwach et al 2011; Wagner et al. 2015). Este aumento puede desempeñar un papel en la aparición de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento (Song et al. 2011). Respecto a la enfermedad de Alzheimer, sabemos que se correlaciona con un patrón aberrante de metilación del genoma (Chouliaras et al 2010; Johnson et al. 2012) puesto que se ha descubierto en el ADN de muestras de hipocampo de pacientes fallecidos con enfermedad de Alzheimer un descenso en los niveles de las bases 5-metilcitosina (5mC) y 5-hidroximetilcitosina (5hmC) con respecto a individuos no afectados (Chouliaras et al. 2013). Sin embargo con relación a 5hmC, enzimas TET y enfermedad de Alzheimer se han encontrado resultados contradictorios (López et al. 2017). Algunos estudios han detectado un aumento significativo de 5hmC en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer acompañado de hipometilación en el promotor del gen de la proteína precursora del amiloide (Bradley-Whitman y Lovell 2013) mientras que otros han mostrado descensos en los niveles de 5mC y de 5hmC en enfermos de Alzheimer que se correlacionan inversamente con el acúmulo de placas de amiloide beta (Chouliaras et al. 2013). Aunque no está claro si las alteraciones epigenéticas son la causa o la consecuencia de la enfermedad, algunos autores sugieren que estas alteraciones en el metiloma son consecuencia o al menos se desencadenan por efecto de las placas de beta amiloide y que estas se asocian a la perturbación del transporte núcleo-citoplasma de diversos reguladores epigenéticos (Mastroeni et al., 2013). En otras investigaciones realizadas sobre individuos afectados con la enfermedad de Alzheimer, tanto en fase preclínica como en estadios avanzados, se ha observado un aumento en los niveles de TET1, 5mC y 5hmC en las neuronas de la región correspondiente al hipocampo y el giro parahipocampal, sin embargo los niveles de 5fC y 5caC se encontraban disminuidos en estas mismas neuronas. Dichos cambios no se observaron en controles sanos de edad similar. Estos datos de la existencia de patrones alterados de metilación en regiones vulnerables del cerebro antes del inicio de la clínica de la enfermedad de Alzheimer sugieren un posible rol en la patogénesis de la enfermedad (Bradley-Whitman y Lovell 2013).

Otros estudios sobre ratones envejecidos no afectados por la enfermedad de Alzheimer pero que muestran cierto deterioro cognitivo presentan un descenso en los niveles de 5hmC y menor expresión de las enzimas TET, concretamente TET1 y TET2 que disminuyen en el hipocampo con la edad lo que sugiere un papel, al menos potencial, en el envejecimiento (Jessop and Toledo-Rodriguez, 2018). En ese mismo estudio se ha podido comprobar que el ejercicio físico regular recupera parcialmente los niveles de expresión de TET1 y TET2 y además mejora la

memoria de dichos ratones envejecidos. Por otro lado, variantes en el gen de TET1 han sido relacionadas mediante estudios de asociación genética con un aumento del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer (Morgan et al, 2008). También se ha demostrado un descenso relacionado con el envejecimiento en el número de células madre neurales con el consiguiente descenso de la neurogénesis en una zona particular del hipocampo, el giro dentado (Fan et al 2017). Dicho declinar de la neurogénesis puede ser rescatado al aumentar la expresión de TET2 en el cerebro de ratones adultos, mejorando su capacidad cognitiva (Gontier et al. 2018).

Con respecto a TET2, enzima entorno a la que gira este trabajo fin de grado, se ha descrito que el sistema nervioso central es uno de los lugares del organismo con mayor expresión de esta proteína (Uhlén et al. 2015), donde ya hemos visto que el metiloma juega un papel determinante en los procesos de desarrollo, maduración y envejecimiento. En relación con TET2, los elevados niveles de 5hmC en el cerebro y su papel en la regulación génica durante el neurodesarrollo son los que han llevado a estudiar el posible rol de ambos (TET2 y 5hmC) en el cerebro envejecido y las enfermedades neurodegenerativas asociadas (López et al. 2017). Conociendo con mayor detalle el rol de TET2 tanto a nivel fisiológico como fisiopatológico se podría arrojar algo más de luz en esta situación con múltiples resultados aparentemente contradictorios aunque no se puede descartar que complementarios. Se necesitará aplicar nuevos métodos de detección que permitan conocer con seguridad el papel que juega 5hmC en los genes que tienen un papel importante en la enfermedad de Alzheimer como APP, PSEN1 y BACE (Fuso et al, 2005; Wang et al, 2008). Con el fin de ahondar en el posible papel de TET2 en la enfermedad de Alzheimer a través de la modificación 5hmC del ADN, se ha realizado este trabajo de fin de grado.

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

Dada la relevancia de la regulación del metiloma durante el envejecimiento, y la expresión predominante del regulador de la metilación, TET2, en el cerebro, hipotetizamos que TET2 puede contribuir a la aparición o avance de la enfermedad de Alzheimer mediante su función en el ADN. Por ello, con la intención de esclarecer un posible rol de la enzima TET2 en la enfermedad de Alzheimer, planteamos los siguientes objetivos:

(1) Realizar una búsqueda bibliográfica de las posibles conexiones de la proteína TET2 con la enfermedad de Alzheimer y/o el declive cognitivo con la edad.

(2) Analizar la expresión de TET2 en datos de interés previamente publicados y disponibles a través de la plataforma GEO, centrándonos en datos obtenidos mediante chips de ARN (microarrays) que puedan asociar cambios en la expresión de TET2 y el Alzheimer.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.

Para encontrar estudios previos que conectasen a TET2 con el Alzheimer, se procedió a la búsqueda de artículos relacionados con el tema de estudio mediante el uso de los buscadores bibliográficos a través de internet: Google Académico (https://scholar.google.es/) y PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) usando las palabras clave "(Alzheimer) AND (TET2)". Para encontrar datos previos de expresión génica en muestras de enfermos de Alzheimer, se llevó a cabo la búsqueda de datos de datos de expresión determinados por secuenciación masiva (RNA-seq) previamente publicados que pudieran ser útiles para nuestro estudio, tanto murinos como humanos, para analizar los genes de nuestro interés. Esto se llevó a cabo a través de PubMed usando las palabras clave "(Alzheimer) AND (RNA-seq)" y el filtro datos asociados. También se realizó la búsqueda con el repositorio de datos de genómica funcional del NCBI: GEO (Gene Expression Omnibus) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/), usando la palabra clave "Alzheimer" y filtrado por "homo sapiens" y "expression profiling by array".

5.2 ANÁLISIS IN SILICO DE DATOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR MICROARRAY.

Para analizar los datos de expresión génica disponibles en GEO, utilizamos la herramienta GEO2R, accesible online a través de NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/). Esta herramienta permite comparar dos o más grupos de muestras de microarrays para identificar aquellos genes que se expresan diferencialmente. Para llevar a cabo la comparación GEO2R utiliza los paquetes estadísticos GEOquery y Limma R, del proyecto Bioconductor (http://www.bioconductor.org). Este proyecto se basa en la utilización del lenguaje de programación R para analizar los datos y GEO2R permite realizar el análisis estadístico a través de una interfaz sencilla sin necesidad de conocer dicho lenguaje de programación. Con GEO2R podemos conocer diferentes parámetros estadísticos como el cambio de expresión de genes entre diferentes muestras (log2-fold change) o el Pvalor de dichos cambios, entre otros y obtener una serie de gráficos con los que visualizar los genes diferencialmente expresados.

6. RESULTADOS.

6.1 BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA: ALZHEIMER Y TET2.

Recordemos que en la enfermedad de Alzheimer se produce una atrofia cerebral progresiva, bilateral y difusa, que comienza en regiones mesiales temporales, en donde se encuentra el hipocampo entre otras estructuras, para afectar luego al neocórtex, sobre todo al temporal, parietal y frontal. La lesión y posterior destrucción neuronal ocurre en relación con la aparición tanto de los ovillos neurofibrilares intracelulares como de las placas de amiloide beta extracelulares. A continuación, las células de la glía, astrocitos y microglía intentan sin éxito la eliminación del amiloide beta, generándose un proceso inflamatorio que junto con el propio efecto tóxico de las placas contribuye a lesionar a las neuronas (De la Vega y Zambrano 2013).

Por otra parte ya hemos mencionado que en condiciones fisiológicas TET2 se expresa altamente en el tejido cerebral (Hulén et al. 2015 y Antunes et al. 2019) y que el envejecimiento y las alteraciones del metiloma se correlacionan con la predisposición a ciertas enfermedades como el Alzheimer (Horvath y Raj 2018), por lo que diversos autores han orientado sus líneas de investigación sobre el posible rol de 5mC, 5hmC y TET2 en la enfermedad de Alzheimer. En aras de arrojar luz sobre las múltiples incógnitas que todavía existen sobre la etiología y fisiopatología del Alzheimer vamos a comentar una serie de trabajos llevados a cabo tanto en modelos animales como con muestras de cerebro de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer en los cuales los investigadores se centran en la alteración del metiloma y la posible implicación de los enzimas TET. Las principales conclusiones respecto a la presencia de 5hmC y la expresión de TET2 en estos estudios se volverá a abordar en el contexto de todo lo expuesto hasta el momento en al apartado discusión.

Environmental Enrichment Improves Cognitive Deficits, AD Hallmarks and Epigenetic Alterations Presented in 5xFAD Mouse Model. Griñán-Ferré C, et al. *Front Cell Neurosci*. 2018.

En este estudio se utilizó el modelo de Alzheimer en ratones conocido como 5xFAD. Dichos ratones expresan los genes humanos APP (proteína precursora del amiloide) y PSEN1 (presenilina1) con 5 mutaciones asociadas a la enfermedad de Alzheimer en humanos. Los modelos desarrollan muchas de las características relacionadas con la enfermedad de Alzheimer de una forma temprana y agresiva, se pueden observar placas de amiloide acompañadas de inflamación en ratones de dos meses de edad y pérdida neuronal desde los 6 meses que se acompaña de déficits cognitivos y motores (Alzforum 2019).

La investigación sobre el modelo murino 5xFAD de enfermedad de Alzheimer ha demostrado que el enriquecimiento ambiental en estos ratones disminuye el deterioro cognitivo con respecto al mismo modelo sin enriquecimiento ambiental, llegando a presentar una función cognitiva similar a la de los ratones silvestres (wild type). Estos ratones con enriquecimiento ambiental

además muestran valores más bajos de metilación del DNA, y un aumento tanto de los niveles de 5hmC como de la expresión de TET2 en las muestras obtenidas de hipocampo. También se observa en los ratones 5xFAD sin enriquecimiento ambiental (5xFAD-Ct) un aumento en la expresión de TET2 con respecto a los silvestres pero sin alcanzar significación estadística (p=0.075).

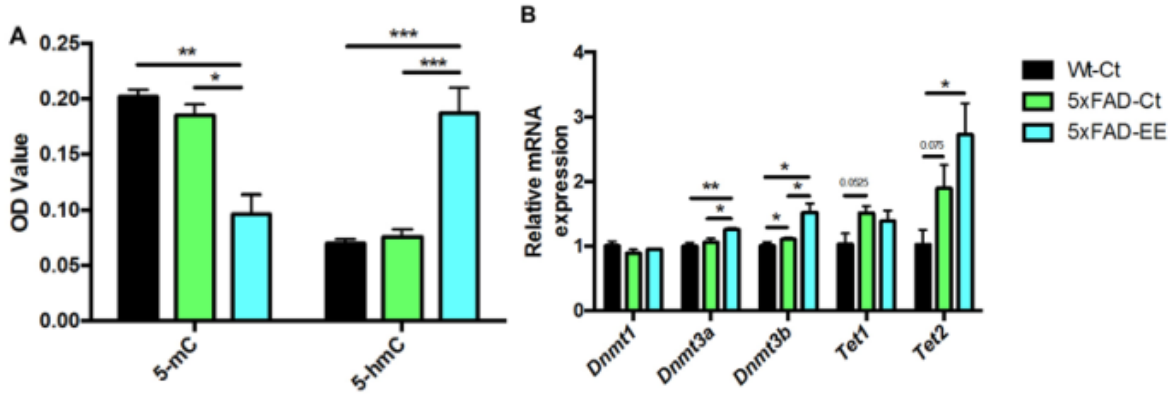

Figura 6.(A) Niveles de 5mC y 5hmC en el hipocampo de ratones silvestres (Wt-Ct) y ratones modelo de Alzheimer control (5xFAD-Ct) o con enriquecimiento ambiental (5xFAD-EE). (B) Expresión de los niveles de enzimas implicados en la metilación. ∗p < 0.05; ∗∗p < 0.01; ∗∗∗p < 0.001. Adaptado de Griñan-Ferré et al. Front. Cell. Neurosci. 2018.

TET2 Regulates the Neuroinflammatory Response in Microglia. Carrillo-Jimenez A, et al. *Cell Rep*. 2019.

Sobre ese mismo modelo 5xFAD se han realizado otros experimentos que evalúan la expresión de TET2 también sobre el hipocampo, pero centrándose sobre una subpoblación celular conocida como la microglía, implicada en múltiples funciones en el sistema nervioso central como la respuesta inflamatoria, organización sináptica, soporte trófico de las neuronas, reemplazo de la mielina, fagocitosis y control de la excitabilidad neuronal (Bachiller S et al. 2018).

Entre los resultados destaca el aumento de expresión de TET2 en las células de la microglía próximas a las placas de amiloide beta tanto en el modelo 5xFAD como en una de las tres muestras de cadáveres humanos diagnosticados de enfermedad de Alzheimer en comparación con la microglía más alejada de dichas placas. En las otras dos muestras humanas no se alcanzaron valores de significación estadística aunque sí se observa una tendencia al aumento de la expresión de TET2 en las placas de amiloide.

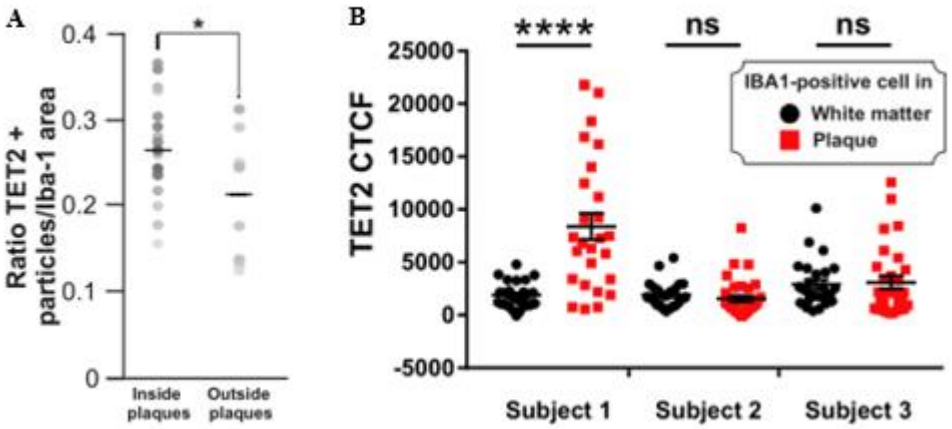

Figura 7.(A) Análisis de colocalización de TET2, Iba-1 y placas de amiloide beta en el hipocampo de ratones 5xFAD de 18 meses de edad. (B) Niveles de expression de TET2 en la corteza temporal de 3 sujetos fallecidos con enfermedad de Alzheimer. CTCF: Fluorescencia celular total corregida. *p < 0.05, ****p < 0.0001, ns: no significativo. Adaptado de Carrillo-Jimenez A, et al. Cell Rep. 2019.

Reduction of Tet2 exacerbates early-stage Alzheimer's pathology and cognitive impairments in 2 × Tg-ad mice. Li L, et al. *Hum Mol Genet*. 2020.

En estudios realizados sobre otro modelo murino de la enfermedad de Alzheimer conocido como 2xTg-AD que sobreexpresa dos formas mutantes de genes ligados al Alzheimer, APP y PSEN1 se ha detectado en el hipocampo un descenso en los niveles de 5hmC y en la expresión de TET2 que coinciden con la acumulación de placas de amiloide beta (Li L et al. 2020 a). En este caso se observaron en el hipocampo descensos en la expresión de TET2 desde fases iniciales de la enfermedad, y los modelos a pesar de ser todavía jóvenes presentaron características típicas de fases avanzadas de la enfermedad de Alzheimer como la acumulación de placas de amiloide beta, sobrecrecimiento de la microglía y aumentos de la producción de factores proinflamatorios. Adicionalmente los ratones 2xTg-AD a los que se les silenció TET2 mediante el ARN de interferencia usado adenovirus (AAV-shTet2) mostraron un descenso en sus capacidades de aprendizaje y memorización comparados con los controles de igual edad que expresaban el RNA de interferencia control (AAV-sh-Scramble). En línea con esta observación, la restauración de la expresión de TET2 en células madre neurales adultas aisladas del hipocampo de los modelos 2xTg-AD aumentó los niveles de 5hmC así como su capacidad de regeneración, sugiriendo un posible papel de TET2 como diana sobre la que actuar ante el envejecimiento normal y la enfermedad de Alzheimer.

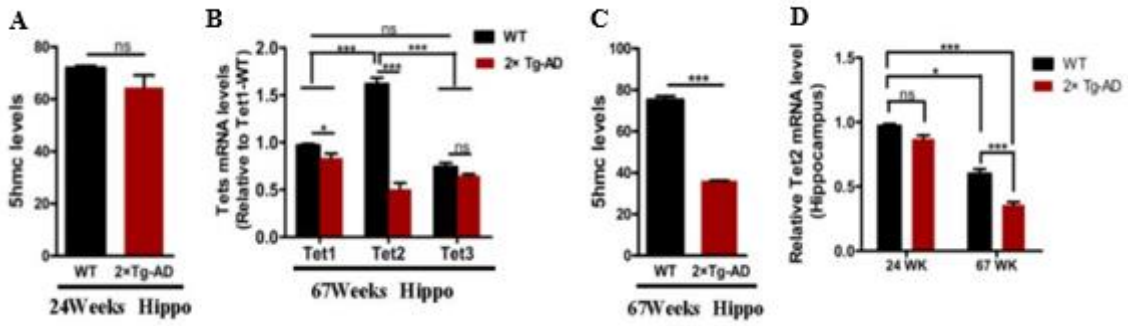

Figura 8. (A) Niveles hipocampales de 5hmC en ratones silvestres y 2xTg-AD a las 24 semanas de vida. (B) Niveles de ARN de enzimas TET en el hipocampo de ratones silvestres y 2xTg-AD de 67 semanas de vida. (C) Niveles hipocampales de 5hmC en ratones silvestres y 2xTg-AD a las 67 semanas de vida. (D) Niveles de expresión de TET2 en el hipocampo de ratones silvestres y 2xTg-AD a las 24 y 67 semanas de vida. Adaptado de Li L et al. Hum Mol Genet. 2020.

Role of Ten eleven translocation-2 (Tet2) in modulating neuronal morphology and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease. Li L et al. *J Neurochem*. 2020.

Otro estudio llevado a cabo por el mismo equipo sobre el modelo 2xTg-AD demostró que el descenso de la expresión de TET2 se asocia con la acumulación de placas de amiloide beta en el cerebro de ratones 2xTg-AD envejecidos mientras que el aumento de la expresión de TET2 protege a las neuronas contra la toxicidad producida por las placas de amiloide beta 42. El silenciamiento de TET2 en ratones jóvenes 2xTg-AD provoca una alteración cognitiva similar a la de los ratones 2xTg-AD envejecidos. La restauración de los niveles de expresión de TET2 mejora la memoria y disminuye la carga de amiloide en ratones 2xTg-AD de mediana edad. En este mismo estudio se observó in vitro que el descenso en los niveles de TET2 se correlaciona con el daño en las sinapsis neuronales mientras que al aumentar la expresión de TET2 se recuperaba tanto el número de dendritas, así como su longitud y densidad en cultivos de neuronas hipocampales. También se pudo relacionar el descenso de TET2 con la alteración en la expresión de ARNs largos no codificantes y microARNs implicados en vías de señalización relacionados con la neurogénesis hipocampal. Varios de estos ARNs que son dianas de TET2 se expresan de forma aberrante en los ratones envejecidos 2xTg-AD pero no en los controles silvestres de igual edad (Li et al. 2020 b). A pesar de la correlación entre TET2 y 5hmC no se determinan los valores de 5hmC en este trabajo.

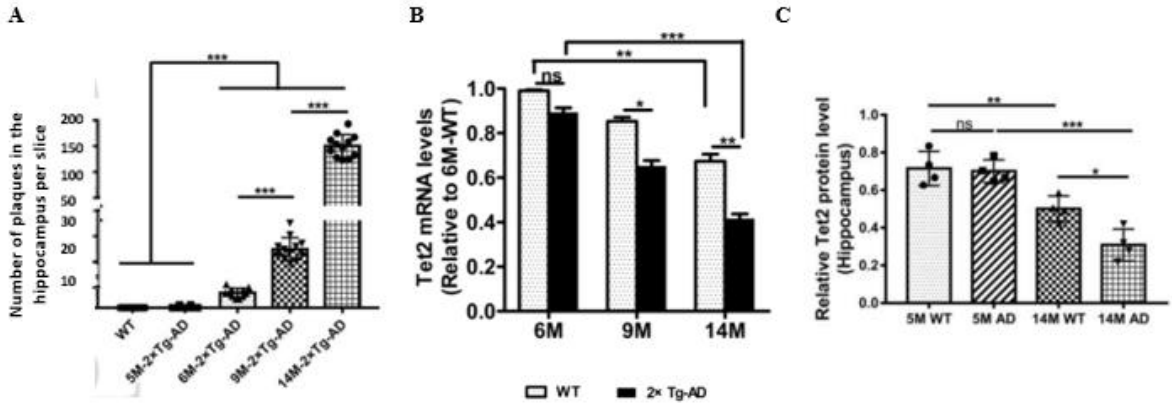

Figura 9.(A) Niveles de placas de amiloide beta en ratones silvestres y 2xTg-AD de 5,6,9 y 14 meses de vida. (B) Niveles de ARN de TET2 en el hipocampo de ratones silvestres y 2xTg-AD de 6, 9 y 14 meses de vida en comparación con ratones silvestres de 6 meses. (C) Niveles de TET2 en el hipocampo de ratones silvestres y 2xTg-AD de 5 y 14 meses de vida. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001, ns: estadísticamente no significativo. Adaptado de Li et al. J. Neurochem 2020.

Global changes in DNA methylation an hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. Coppieters N et al. *Neurobiol Aging*. 2014.

En tejido cerebral humano obtenido postmortem del Neurological Foundation of New Zealand Human Brain Bank se ha estudiado por parte de Coppieters y colaboradores, los niveles de metilación e hidroximetilación global del ADN genómico. Se ha identificado, mediante técnicas inmunohistoquímicas, un gran aumento en los niveles de 5mC y 5hmC en dos regiones del cerebro afectadas en la enfermedad de Alzheimer, el giro frontal medio y el giro temporal medio, en comparación con los controles. Dichos niveles se correlacionan positivamente entre ellos sin que se haya detectado la influencia del género, la edad, el tiempo desde la muerte hasta el procesamiento, o tiempo en el banco de muestras cerebrales. Los niveles de 5mC y 5hmC también se correlacionan positivamente con las características anatomopatológicas de la enfermedad, las placas de amiloide beta, los ovillos neurofibrilares, y los niveles de ubiquitina, sugiriendo una relación con la severidad de la patología. Mediante técnicas de inmunofluorescencia se encontró que tanto en controles como en cerebros de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer los niveles de 5mC y de 5hmC son menores en los astrocitos y en la microglía en comparación con las neuronas. Adicionalmente se observó que en un mismo núcleo, 5mc y 5hmC apenas coexisten. Otro factor que puede influir en las concentraciones de estos metabolitos es la exposición ambiental a sustancias como el plomo (Wu et al. 2008) o la dieta (Fuso et al. 2011) que al tener la capacidad de modificar 5mC pueden aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (Lahiri et al. 2009).

No se analizó en este trabajo los niveles de expresión de los enzimas implicados en la metilación y desmetilación del ADN, DNMTs ni TETs.

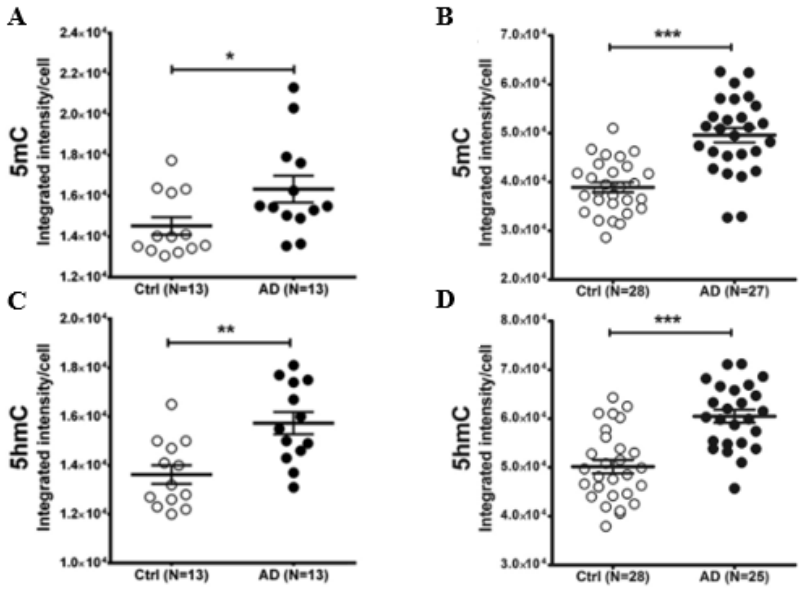

Figura 10. (A) Niveles de 5mC en la materia gris del giro frontal medial en muestras de controles y enfermos de Alzheimer. (B) Niveles de 5mC en la materia gris del giro temporal medial en muestras de controles y enfermos de Alzheimer. (C) Niveles de 5hmC en la materia gris del giro frontal medial en muestras de controles y enfermos de Alzheimer. (D) Niveles de 5hmC en la materia gris del giro temporal medial en muestras de controles y enfermos de Alzheimer. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.0001. Adaptado de Coppieters N et al. Neurobiol Aging. 2014.

Non-coding and Loss-of-Function Coding Variants in TET2 are Associated with Multiple Neurodegenerative Diseases. Cochran JN et al. *Am J Hum Genet*. 2020.

Este trabajo llevado a cabo por Cochran y colaboradores estudió la asociación entre mutaciones en TET2 que producen variantes no codificantes o con pérdida de función y múltiples enfermedades neurodegenerativas entre las que destaca el Alzheimer de inicio precoz, antes de los 65 años de vida. En este estudio se llevó a cabo la secuenciación genómica de 227 casos de enfermos de Alzheimer y de 671 controles, así como el análisis de replicación en 16.434 casos y 15.587 controles, encontrándose que variantes no codificantes o con pérdida de función de TET2 son más habituales en los casos que en los controles con una ratio de probabilidad de 2.3 y un intervalo de confianza al 95% de 1.6-3.4. Dichas variantes no codificantes mostraron una alta prevalencia de mutaciones en regiones reguladoras como los lugares de inicio de la transcripción.

6.2 ANÁLISIS *IN SILICO* DE LA EXPRESIÓN DE LOS ENZIMAS TET EN MUESTRAS DE ARN DE CEREBROS HUMANOS ENVEJECIDOS.

Comenzamos por el análisis de los datos de microarray obtenidos por Hokama y colaboradores (Hokama M, Cereb Cortex. 2014). En este estudio con el fin de identificar alteraciones moleculares en los cerebros de enfermos de Alzheimer se realizó un estudio comparativo mediante el análisis del ARN de muestras de cerebro del modelo murino de enfermedad de

Alzheimer 3xTg-AD y de cerebros donados por voluntarios de la cohorte de Hisayama. El modelo 3xTg-AD es ampliamente utilizado en la investigación sobre la enfermedad de Alzheimer. Contiene tres mutaciones asociadas con la formar familiar de la enfermedad afectando a los genes APP, PSEN1 y MAPT. Estos ratones muestran disfunción sináptica previa a la aparición de las características lesiones anatomopatológicas de la enfermedad de Alzheimer. Desde los seis meses de edad se aprecia una deposición progresiva de placas de amiloide beta en el sistema nervioso central, incluyendo el hipocampo y la corteza cerebral. Los ovillos neurofibrilares no son observables a los seis meses pero sí a los doce. Las dificultades cognitivas se aprecian desde los cuatro meses de edad, manifestándose como déficits en el aprendizaje y en la memoria.

Por otro lado, la cohorte está compuesta por parte de la población de Hisayama (Japón), en la que se incluye a sujetos a partir de los 40 años y a los que se les viene realizando el seguimiento desde el año 1961. Dicha cohorte contaba en un inicio con 1618 voluntarios y en la actualidad el número de participantes en la cohorte es mayor de 3100 individuos (Ninoyima 2018). En este esta cohorte se estudian detalladamente los diversos factores de riesgo asociados a enfermedades íntimamente ligadas al estilo de vida como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y la demencia y sus datos son de gran valor puesto que existe un porcentaje elevado de participación por parte de la población, entre el 70% y el 80% de media en estos casi 60 años, porque el porcentaje de pérdidas es menor al 1% y porque se realiza una tasa de autopsias del 75%. En el estudio llevado a cabo por Hokama et al, se analizaron mediante el análisis ANOVA de tres vías los datos de expresión de ARN mediante microarrays la corteza frontal, la corteza temporal y el hipocampo de los cerebros donados tanto diagnosticados como no diagnosticados de enfermedad de Alzheimer. Además, se realizaron estudios comparativos con respecto al modelo murino detectándose una expresión alterada en ciertos genes relacionados con la diabetes mellitus en los sujetos afectados por la enfermedad de Alzheimer. Los cambios observados en el hipocampo de los enfermos de Alzheimer mostraron significativamente la mayor alteración en perfil de expresión génica.

Con estos datos, nosotros analizaremos si existe o no alteración en la expresión de los niveles de TET1, TET2, TET3, DNMT1, DNMT3A y DNMT3B en los enfermos de Alzheimer con respecto a los controles, y utilizaremos como referencia de control al gen APP. Para ello contamos con muestras postmortem de 88 sujetos, de los cuales 26 han sido diagnosticados anatomopatológicamente de enfermedad de Alzheimer. Entre los diferentes tejidos contamos con 33 muestras de corteza frontal, 15 de las cuales pertenecen a enfermos de Alzheimer, 29 muestras de corteza temporal de las que 10 pertenecen a enfermos de Alzheimer y 18 muestras de hipocampo de las que 8 pertenecen a enfermos de Alzheimer.

Muestras	Gen	log2FC (EA/Cont)	Pvalor crudo	Pvalor ajustado	Expresión en EA
Control vs EA	TET1	-0.02178213	6.24×10^{-1}	7.61×10^{-1}	Disminuida
	TET2	-0.05796862	1.87×10^{-1}	3.65×10^{-1}	Disminuida
	TET3	0.12474135	2.26×10^{-2} *	9.78×10^{-2}	Aumentada
	DNMT1	0.06918921	2.96×10^{-2} *	1.17×10^{-1}	Aumentada
	DNMT3A	-0.04941473	1.76×10^{-1}	3.51×10^{-1}	Disminuida
	DNMT3B	-0.10698247	2.17×10^{-2} *	9.52×10^{-2}	Disminuida
	APP	0.16758562	3.69×10^{-5} ****	1.32×10^{-3} **	Aumentada

Tabla 1.Expresión diferencial de los genes a estudio en muestras cerebrales de sujetos afectados por la enfermedad de Alzheimer con respecto a los controles. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001.

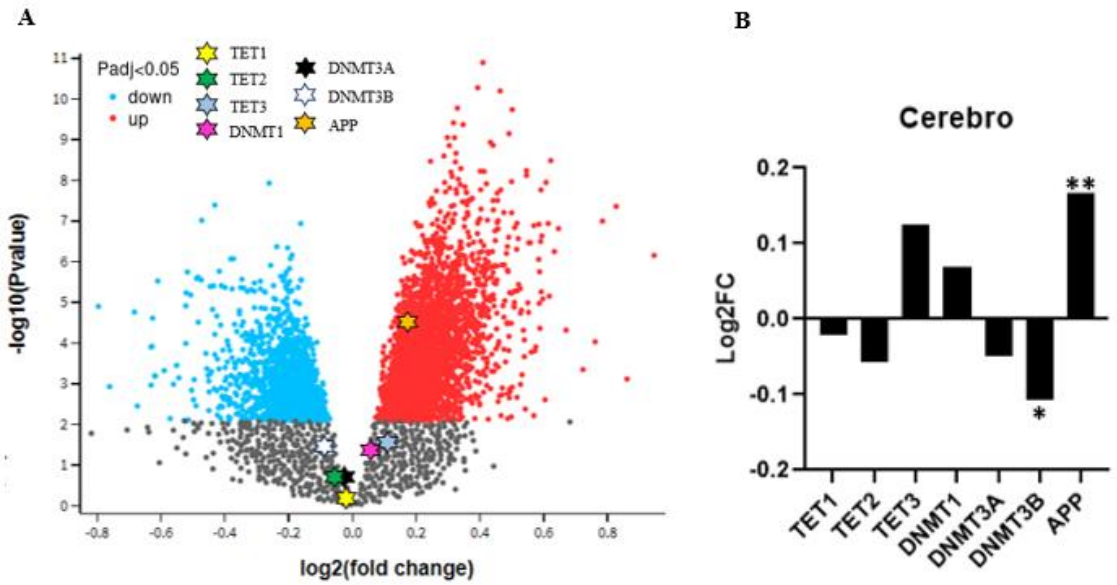

Figura 11. (A) Gráfico volcán que muestra los genes diferencialmente expresados (con un Pvalor <0.05) en las muestras de tejido cerebral de enfermos de Alzheimer respecto a los controles. En azul se muestran los genes significativamente disminuidos y en rojo significativamente aumentados. Se han destacado los distintos genes TET, DNMT y el control APP. El Pvalor ajustado de los genes TET y DNMT no es significativo (>0.05). (B) Diferencia en los niveles de expresión de los diversos genes a estudio en muestras cerebrales de enfermos de Alzheimer con respecto a controles. *Pvalor crudo significativo, **Pvalor ajustado significativo.

Muestras	Gen	log2FC (EA/Cont)	Pvalor crudo	Pvalor ajustado	Expresión en EA
Corteza temporal Control vs EA	TET1	-0.0762995	3.26×10^{-1}	7.23×10^{-1}	Disminuida
	TET2	-0.0374556	5.43×10^{-1}	8.51×10^{-1}	Disminuida
	TET3	0.0801258	4.69×10^{-1}	8.14×10^{-1}	Aumentada
	DNMT1	0.0940978	1.22×10^{-1}	4.98×10^{-1}	Aumentada
	DNMT3A	-0.0708527	1.45×10^{-1}	0.531×10^{-1}	Disminuida
	DNMT3B	-0.0299407	5.65×10^{-1}	8.62×10^{-1}	Disminuida
	APP	0.1186726	9.41×10^{-3} **	1.75×10^{-1}	Aumentada

Tabla 2. Expresión diferencial de los genes a estudio en muestras de corteza temporal en sujetos afectados por la enfermedad de Alzheimer con respecto a los controles. **p<0.01.

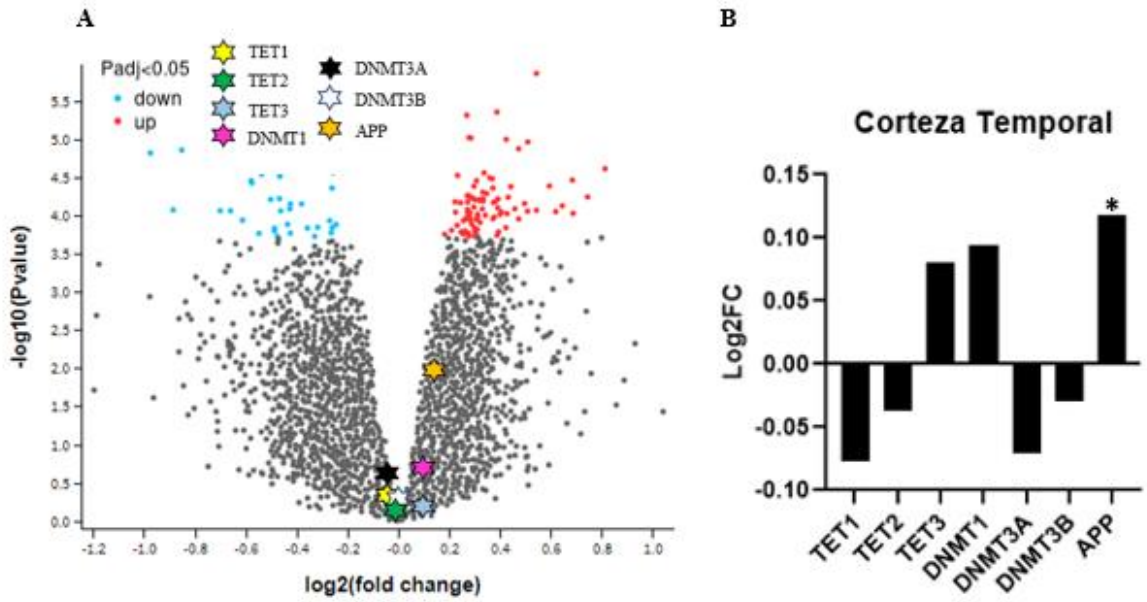

Figura 12. (A) Genes diferencialmente expresados (con un Pvalor <0.05) en las muestras de corteza temporal de enfermos de Alzheimer respecto a los controles. Se destacan las posiciones que ocuparían los distintos genes TET, DNMT y el control APP. El Pvalor ajustado de los genes TET y DNMT es >0.05. (B) Diferencia en los niveles de expresión de los diversos genes a estudio en muestras de corteza temporal de enfermos de Alzheimer con respecto a controles. *Pvalor crudo significativo, **Pvalor ajustado significativo.

Muestras	Gen	log2FC (EA/Cont)	Pvalor crudo	Pvalor ajustado	Expresión en EA
Hipocampo Control vs EA	TET1	-0.02916625	7.81×10^{-1}	8.66×10^{-1}	Disminuida
	TET2	-0.124343	3.35×10^{-1}	5.21×10^{-1}	Disminuida
	TET3	0.274382	5.97×10^{-3}**	9.46×10^{-2}	Aumentada
	DNMT1	0.04140825	5.53×10^{-1}	7.06×10^{-1}	Aumentada
	DNMT3A	-0.0583075	4.83×10^{-1}	6.49×10^{-1}	Disminuida
	DNMT3B	-0.1558035	1.77×10^{-1}	3.63×10^{-1}	Disminuida
	APP	0.272545	2.48×10^{-2}*	1.50×10^{-1}	Aumentada

Tabla 3.Expresión diferencial de los genes a estudio en muestras de hipocampo en sujetos afectados por la enfermedad de Alzheimer con respecto a los controles. *p<0.05, **p<0.01.

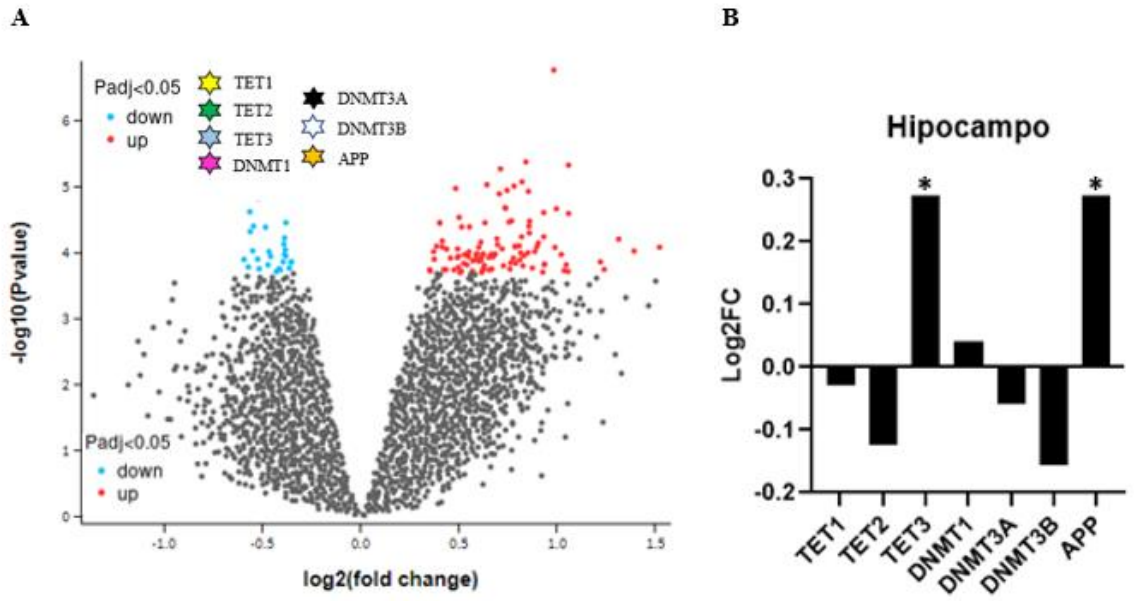

Figura 13.(A) Genes diferencialmente expresados (con un Pvalor <0.05) en las muestras de hipocampo de enfermos de Alzheimer respecto a los controles. Se destacan las posiciones que ocuparían los distintos genes TET, DNMT y el control APP. El Pvalor ajustado de los genes TET y DNMT es >0.05. (B) (B) Diferencia en los niveles de expresión de los diversos genes a estudio en muestras de hipocampo de enfermos de Alzheimer con respecto a controles. *Pvalor crudo significativo, **Pvalor ajustado significativo.

Muestras	Gen	log2FC (EA/Cont)	Pvalor crudo	Pvalor ajustado	Expresión en EA
Corteza Frontal Control vs EA	TET1	0.024822	6.73×10^{-1}	9.38×10^{-1}	Aumentada
	TET2	-0.02296089	7.04×10^{-1}	9.46×10^{-1}	Disminuida
	TET3	0.07773522	2.41×10^{-1}	7.30×10^{-1}	Aumentada
	DNMT1	0.04374844	3.19×10^{-1}	7.86×10^{-1}	Aumentada
	DNMT3A	-0.06751389	1.96×10^{-1}	6.88×10^{-1}	Disminuida
	DNMT3B	-0.09262622	1.53×10^{-2} *	2.97×10^{-1}	Disminuida
	APP	0.11000889	1.43×10^{-2} *	2.91×10^{-1}	Aumentada

Tabla 4. Expresión diferencial de los genes a estudio en muestras de corteza frontal en sujetos afectados por la enfermedad de Alzheimer con respecto a los controles. *P<0.05.

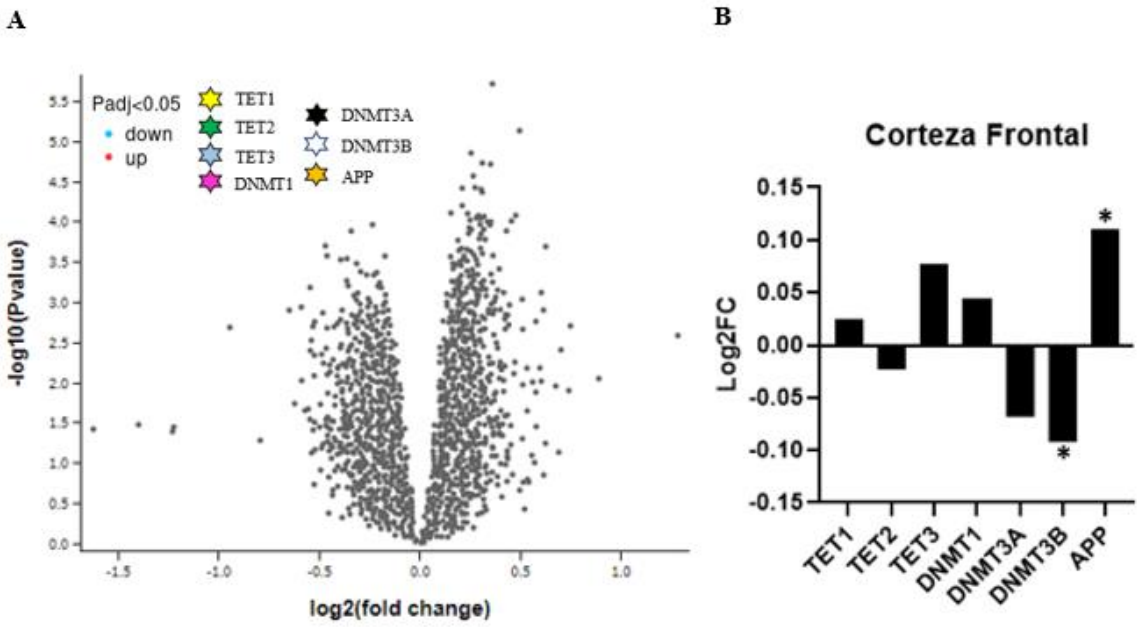

Figura 14.(A) Genes diferencialmente expresados (con un Pvalor <0.05) en las muestras de corteza frontal de enfermos de Alzheimer respecto a los controles. Se destacan las posiciones que ocuparían los distintos genes TET, DNMT y el control APP. El Pvalor ajustado de los genes TET y DNMT es >0.05. (B) (B) Diferencia en los niveles de expresión de los diversos genes a estudio en muestras de corteza frontal de enfermos de Alzheimer con respecto a controles. *Pvalor crudo significativo, **Pvalor ajustado significativo.

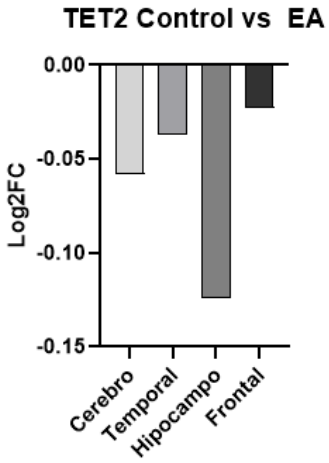

Figura 15.Diferencias por localización anatómica en los niveles de expresión de TET2 en enfermos de Alzheimer con respecto a controles.

7. DICUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

A pesar de que el rol de 5mC en el ADN en el cerebro no se ha descifrado por completo y sigue siendo controvertido, existe evidencia de que la alteración de ciertos mecanismos fisiológicos en la enfermedad de Alzheimer como la plasticidad de las sinapsis, el aprendizaje y la memoria, al menos en parte, son regulados por 5mC (Day y Sweatt, 2011). En el cerebro humano adulto, 5mC mayoritariamente existe en regiones intragénicas, mientras que 5hmC se encuentra preferentemente en regiones promotoras de genes implicados en el transporte de iones, desarrollo neuronal, y muerte celular (Jin et al. 2011). En nuestra revisión bibliográfica hemos podido observar diferentes resultados con respecto a los niveles de 5mC, 5hmC y expresión de TET2 tanto en pacientes como en diversos modelos de enfermedad de Alzheimer.

Con respecto a los niveles de 5mC y 5hmC los datos de Coppieters y colaboradores concuerdan con los del estudio ya mencionado anteriormente llevado a cabo por Bradley-Whitman y Lovell, en los que se observaron aumentos en los niveles de 5mC y 5hmC en el hipocampo de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer (Bradley-Whitman y Lovell, 2013). En ese mismo estudio se evidenció que el patrón de metilación y desmetilación hipocampal se afectaba antes de que apareciese la sintomatología, con los mencionados aumentos de 5mC y 5hmC pero también con la disminución de 5-carboxilcitosina y 5-formilcitosina, por lo que se hipotetiza con la posible disfunción de los mecanismos de reparación del metiloma. Sin embargo, estos resultados se contradicen con otros dos estudios como los llevados a cabo por Chouliaras y colaboradores y Griñán-Ferré y colaboradores. En el primero se evidenció una hipometilación global en el hipocampo y en la corteza entorrinal de enfermos afectados de Alzheimer (Chouliaras et al 2010), y en el segundo, realizado sobre el modelo murino 5xFAD (que expresa múltiples genes relacionados con la enfermedad de Alzheimer), se ha observado en muestras

de hipocampo un descenso en los niveles de 5mC y un aumento en los niveles de 5hmC (Griñán-Ferré et al. 2018).

En relación con los niveles de expresión de TET2 también encontramos discrepancias entre estudios. Para Griñán-Ferré y colaboradores los cambios observados en el metiloma se acompañan de un aumento en la expresión de TET2, DNMT3A y DNMT3B en los modelos de ratones 5xFAD sin enriquecimiento ambiental y con enriquecimiento ambiental (Figura 6). Dicho incremento en la expresión de los genes mencionados es mayor en el modelo con enriquecimiento ambiental y se acompaña de un nivel cognitivo similar al de los ratones silvestres en contraposición al modelo sin enriquecimiento ambiental que muestra un evidente deterioro cognitivo. De entre los genes mencionados el que muestra un aumento mayor de su expresión es con diferencia TET2, aunque por supuesto faltan pruebas experimentales decisivas que justifiquen los resultados a nivel cognitivo a la función de este único gen.

Con respecto al mismo modelo murino, Carrillo-Jiménez y colaboradores han descrito el aumento en la expresión de TET2 en las células de la microglía próximas a las placas de amiloide beta en ratones con un claro deterioro cognitivo. También pudieron observar el aumento en la expresión de TET2 en células de la microglía próximas a placas de amiloide beta en tres muestras de cerebros de humanos fallecidos con la enfermedad de Alzheimer (Figura 7). Por el contrario otros autores han relacionado la enfermedad de Alzheimer con el descenso en los niveles de expresión de TET2. Mi y colaboradores han descrito que la actividad de TET2 en el sistema nervioso central se correlaciona positivamente con la supervivencia neuronal (Mi et al. 2015). Otros trabajos han relacionado el déficit del enzima TET2 en el hipocampo de ratones con el proceso normal de envejecimiento y con alteraciones en los procesos de neurogénesis y cognición (Gontier et al. 2018). También han demostrado Gontier y colaboradores que al restablecer la expresión de TET2 en el hipocampo de dichos ratones viejos estos recuperan la neurogénesis y mejoran cognitivamente. A pesar de estas aseveraciones, Wu y Zhang advierten que la interpretación de dichos datos debe llevarse a cabo con cautela puesto que algunos de los efectos observados pueden deberse a funciones de TET no relacionadas con su actividad catalítica o bien deberse a alteraciones provocadas durante el desarrollo y no a disfunción de neuronas maduras (Wu y Zhang 2017). En concordancia con Gontier y colaboradores los trabajos llevados a cabo por Li et al. en el modelo de la enfermedad de Alzheimer 2xTg-AD demostraron un descenso en los niveles de expresión de TET2 en comparación con el ratón silvestre desde fases iniciales de la enfermedad. Además en dicho modelo pudieron demostrar que el silenciamiento de TET2 in vivo produce un empeoramiento cognitivo así como que la restauración de los niveles de expresión de TET2, tanto in vitro como in vivo aumentan la regeneración neuronal y mejoran la memoria además de disminuir la carga de amiloide en ratones 2xTg-AD de mediana edad (figuras 8 y 9). En esa misma línea se puede clasificar al trabajo llevado a cabo por Cochran et al. que muestra el papel de múltiples mutaciones en TET2 que producen pérdida de función o variantes no codificantes y que se correlacionan con el aumento del riesgo de desarrollar EA y otras enfermedades neurodegenerativas.

Por último en el análisis realizado en este TFG hemos podido observar un descenso en los niveles de expresión de TET2 en las muestras de 26 sujetos de la cohorte de Hisayama afectados por la enfermedad de Alzheimer con respecto a sus respectivos controles. Dicho descenso se

observa tanto a nivel cerebral global como en el resto de las áreas analizadas, la corteza temporal, la corteza frontal y el hipocampo, siendo el descenso en la expresión de TET2 más pronunciado en esta última localización anatómica que como hemos comentado previamente se relaciona fundamentalmente con la memoria y es la primera región cerebral en atrofiarse durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Huang 2018; Barkhof et al. 2012). Sin embargo, ninguno de estos cambios es estadísticamente significativo.

Por otra parte, como resultado del análisis realizado podemos observar la tendencia al aumento de expresión de TET3 en los distintos tejidos analizados, incluso alcanzando la significación estadística en las muestras de hipocampo, por lo que sería interesante ahondar en su estudio como otro regulador importante de hidroximetilación del ADN.

A la vista de estos resultados, no se pueden extraer conclusiones definitivas sobre los niveles de expresión de TET2 en el cerebro de los enfermos de Alzheimer aunque la hipótesis sobre el descenso en los niveles de TET2 sea la observada mayoritariamente por la comunidad científica y en este trabajo en particular.

En busca de una explicación para la discordancia observada en lo relativo a los estados de hipermetilación e hipometilación del ADN cerebral, ya indicaron Coppieters y colaboradores anteriormente que pueden deberse a las diversas técnicas utilizadas para identificar las modificaciones del ADN. El uso de técnicas como la secuenciación por bisulfito, empleada tanto por Griñan-Ferré y colaboradores como por Carrillo-Jiménez y colaboradores, con baja capacidad de diferenciación entre 5mC y 5hmC (Nestor et al. 2010) puede ser la responsable de dichas diferencias mientras que las técnicas inmunohistoquímicas llevadas a cabo por Coppieters, Chouliaras, Gontier, Li y sus respectivos colaboradores sí son capaces de discriminar entre dichas bases permitiendo la investigación específica e independiente de la localización de 5mC y 5hmC.

El aumento en la expresión de TET2 observado por Griñan-Ferré y colaboradores en su modelo de enfermedad en contraposición al resto de estudios podría deberse a alguna característica particular de dicho modelo, aunque sí concuerda de su trabajo con respecto al de Li y colaboradores que el aumento todavía mayor en la expresión de TET2 se correlaciona con una mejoría a nivel cognitivo.

También es relevante mencionar un estudio llevado a cabo por Holstege y colaboradores en el que advierten sobre la posibilidad de que el descenso en la expresión de TET2 observada por Cochran et al. en las muestras de sangre de individuos entre los 45 y 90 años de edad y que relacionan con una mayor propensión al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer, sea un hallazgo independiente y no relacionado al encontrarse muy habitualmente mutaciones en los genes TET2 y DNMT3A de las células madre hematopoyéticas en individuos de edad avanzada. Estas mutaciones dan lugar a una descendencia con una ventaja competitiva con respecto al resto de células sanguíneas que se ha relacionado con el aumento de neoplasias hematopoyéticas en los individuos que las portan. Esas mismas mutaciones son extremadamente raras en individuos menores de 40 años (Holstege H et al. 2020).

A pesar de estas discrepancias se puede apreciar la existencia de modificaciones en el patrón de metilación del ADN así como de los niveles de expresión de TET2 que merecen ser estudiados con mayor profundidad. Por otra parte sería de gran interés investigar sobre el papel de TET2 en el ARN de los enfermos de Alzheimer, pues como ya hemos mencionado, recientemente se ha demostrado la capacidad de TET2 de oxidar las bases de 5-metilcitosina también en el ARN regulando así su estabilidad y por lo tanto su función (Guallar D et al. 2018). Y es que en pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer se pueden encontrar desde fases preclínicas múltiples formas oxidadas de diversos ARNs que provocan el enlentecimiento en la síntesis de proteínas, la síntesis de proteínas disfuncionales e incluso pueden inducir la apoptosis neuronal (Nunomura A, Perry G, 2020). Para poder llevar a cabo la investigación sobre el posible papel de TET2 y las modificaciones sobre el ARN será necesario desarrollar tecnología que permita secuenciar y diferenciar de forma fidedigna las modificaciones epigenéticas (sobre el ADN) de las epitranscriptómicas (sobre el ARN).

Por último es de relevancia señalar que el hipocampo es, junto con el bulbo olfatorio, el único área del cerebro en humanos con capacidad de neurogénesis y que esta se mantiene en altos niveles en individuos neurológicamente sanos hasta el final de la vida en contraste con los afectados por la enfermedad de Alzheimer (Moreno-Jiménez et al. 2019) en los cuales ya hemos mencionado que el hipocampo es el primer lugar afectado durante el transcurso de la enfermedad provocando una alteración en el desarrollo de nuevas neuronas que puede ser en parte responsable de los déficits cognitivos que ocurren en esta forma de demencia. Por estas razones se le considera potencialmente como un área de intervención terapéutica en la que TET2 podría tener un papel relevante por todas las características descritas en este TFG y especialmente por los resultados obtenidos en los trabajos llevados a cabo por Li y colaboradores en los que demostraron que el restablecimiento de los niveles de TET2 en el hipocampo del modelo murino 2xTg-AD produce regeneración neuronal acompañada de un descenso de la carga amiloide y de la mejora a nivel cognitivo.

8. CONCLUSIONES.

- El patrón de metilación del ADN está afectado en la enfermedad de Alzheimer.
- La expresión de TET2 en el hipocampo de modelos de Alzheimer murinos está afectada.
- El aumento en los niveles de expresión de TET2 ha demostrado neurogénesis y mejoría a nivel cognitivo en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer.
- Nuestro análisis in silico revela una disminución de los niveles de TET2, aunque no estadísticamente significativa, en distintas áreas cerebrales de individuos con Alzheimer, especialmente en hipocampo.
- Nuestro análisis in silico revela un aumento de los niveles de TET3 en las distintas áreas cerebrales analizadas de individuos con Alzheimer, especialmente en hipocampo, llegando a alcanzar la significación estadística.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Gaugler J, James B, Johnson T, Marin A, Weuve J, Alzheimer's Association. [Internet] 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures. Alzheimers Dement 2020;16(3):391+. Disponible en: https://www.alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures.
2. Alzheimer Europe. [Internet]. Luxemburgo. Dementia in Europe Yearbook 2019. Disponible en: https://www.alzheimer-europe.org/Publications/Dementia-in-Europe-Yearbooks.
3. Amosa Delgado M, Díaz Otero F, García Azorín D, Ríos Blanco JJ et al. Manual CTO de Neurología y neurocirugía, 10ª edición. Madrid. CTO editorial 2018. 3, demencias p.19-23.
4. Huang J. Manual MSD, versión para profesionales [internet]. Kenilworth, NJ., USA Merck Sharp & Dohme Corp., una subsidiaria de Merck & Co., Inc. 2020. Enfermedad de Alzheimer. 2018. Disponible en: https://www.msdmanuals.com/es/professional/trastornos-neurol%C3%B3gicos/delirio-y-demencia/enfermedad-de-alzheimer
5. Barkhof F, Hazewinkel M, Binnewijzend M and Smithuis R. Radiology assistant. [internet] 2012. Dementia, role of MRI. Dispoñible en: https://radiologyassistant.nl/neuroradiology/dementia/role-of-mri#specific-diseases-alzheimers-disease
6. Mann DM, Iwatsubo T, Ihara Y, et al. Predominant deposition of amyloid-beta 42(43) in plaques in cases of Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage associated with mutations in the amyloid precursor protein gene. Am J Pathol. 1996;148(4):1257-1266.
7. Masters CL, Bateman R, Blennow K, et al. Alzheimer's disease. Nature reviews. Disease Primers. 2015 Oct; 1:15056.
8. Kovacech, B.; Skrabana, R.; Novak, M. Transition of tau protein from disordered to misordered in Alzheimer's disease. Neurodegener. Dis. 2010, 7, 24–27.
9. Silva MC, Haggarty SJ. Tauopathies: Deciphering Disease Mechanisms to Develop Effective Therapies. Int J Mol Sci. 2020 Nov 25;21(23):8948.
10. Martin, L.; Latypova, X.; Terro, F. Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. Neurochem. Int. 2011, 58, 458–471.
11. World Health Organization. Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025. Ginebra. 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: https://apps.who.int/iris/handle/10665/259615
12. Gontier G, Iyer M, Shea JM, et al. Tet2 Rescues Age-Related Regenerative Decline and Enhances Cognitive Function in the Adult Mouse Brain. Cell Rep. 2018;22(8):1974-1981.
13. Chouliaras L, Mastroeni D, Delvaux E, Grover A, Kenis G, Hof PR, Steinbusch HW, Coleman PD, Rutten BP, van den Hove DL. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. Neurobiol Aging. 2013 Sep;34(9):2091-9. doi:

10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.021. Epub 2013 Apr 9. PMID: 23582657; PMCID: PMC3955118.
14. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. Cell. 2007 Feb 23;128(4):635-8. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.006. PMID: 17320500 Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 2002;16(1):6–21. doi: 10.1101/gad.947102 .
15. Hotchkiss RD (1948). The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. J Biol Chem 175: 315–332.
16. Holliday R, Pugh JE (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. Science 187: 226–232.
17. Bird AP, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. Cell 40: 91–99
18. Schübeler D (2015). Function and information content of DNA methylation. Nature 517, 321–326.[PubMed: 25592537]
19. Varley, K. E. et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. Genome Res. 23, 555–567 (2013)
20. Schultz, M., He, Y., Whitaker, J. et al. Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. Nature 523, 212–216 (2015).
21. Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, Diez J, Sanchez-Mut JV, Setien F, Carmona FJ, Puca AA, Sayols S, Pujana MA, Serra-Musach J, Iglesias-Platas I, Formiga F, Fernandez AF, Fraga MF, Heath SC, Valencia A, Gut IG, Wang J, Esteller M. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jun 26;109(26):10522-7. doi: 10.1073/pnas.1120658109. Epub 2012 Jun 11. PMID: 22689993; PMCID: PMC3387108
22. Rakyan VK, et al. (2010) Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. Genome Res 20:434–439.
23. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology. 2013 Jan;38(1):23-38. doi: 10.1038/npp.2012.112. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22781841; PMCID: PMC3521964.
24. Jintaridth P, Mutirangura M, Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences. Physiol. Genomics 41, 194–200 (2010).
25. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. Sci Adv. 2016 Jul 29;2(7):e1600584.
26. Koning AP, Gu W, Castoe TA, Batzer MA, Pollock DD. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. PLoS Genet. 2011 Dec;7(12):e1002384. doi: 10.1371/journal.pgen.1002384. Epub 2011 Dec 1. PMID: 22144907; PMCID: PMC3228813.
27. Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR (2006). Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. Curr Top Microbiol Immunol 310:211–250.
28. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. Cell. 2013;153(6):1194-1217.
29. Johnson AA, Akman K, Calimport SR, Wuttke D, Stolzing A, de Magalhães JP. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. Rejuvenation Res. 2012;15(5):483-494. doi:10.1089/rej.2012.1324

30. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. Nat Rev Genet. 2017 Sep;18(9):517-534. doi: 10.1038/nrg.2017.33. Epub 2017 May 30. PMID: 28555658.
31. López-Moyado IF, Tsagaratou A, Yuita H, Seo H, Delatte B, Heinz S, Benner C, Rao A. Paradoxical association of TET loss of function with genome-wide DNA hypomethylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Aug 20;116(34):16933-16942. doi: 10.1073/pnas.1903059116. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31371502; PMCID: PMC6708373.
32. Jung, M., Pfeifer, G.P. Aging and DNA methylation. BMC Biol 13, 7 (2015).
33. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, and Baylin SB (1994). Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. Nat. Genet 7, 536–540. [PubMed: 7951326]
34. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, and Issa JP (1998). Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. Cancer Res 58, 5489–5494. [PubMed: 9850084]
35. Fraga MF, and Esteller M (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. Trends Genet 23,413–418. [PubMed: 17559965]
36. Field AE, Robertson NA, Wang T, Havas A, Ideker T, Adams PD. DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. Mol Cell. 2018;71(6):882-895. doi:10.1016/j.molcel.2018.08.008
37. Horvath S (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome Biol 14, R115.[PubMed: 24138928]
38. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y,et al. (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. Mol. Cell 49,359–367. [PubMed: 23177740]
39. 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 Feb 3;15(2):R24. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r24. PMID: 24490752; PMCID: PMC4053864.
40. Zhang Y, Hapala J, Brenner H, Wagner W. Individual CpG sites that are associated with age and life expectancy become hypomethylated upon aging. Clin Epigenetics. 2017;9:9.
41. Bell CG, Lowe R, Adams PD, Baccarelli AA, Beck S, Bell JT, Christensen BC, Gladyshev VN, Heijmans BT, Horvath S, Ideker T, Issa JJ, Kelsey KT, Marioni RE, Reik W, Relton CL, Schalkwyk LC, Teschendorff AE, Wagner W, Zhang K, Rakyan VK. DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations. Genome Biol. 2019 Nov 25;20(1):249. doi: 10.1186/s13059-019-1824-y. PMID: 31767039; PMCID: PMC6876109.
42. Klutstein, M., Nejman, D., Greenfield, R., and Cedar, H. (2016). DNA methylation in cancer and aging. Cancer Res. 76, 3446–3450
43. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. Nat Rev Genet. 2018 Jun;19(6):371-384. doi: 10.1038/s41576-018-0004-3. PMID: 29643443.
44. Fahy GM, Brooke RT, Watson JP, Good Z, Vasanawala SS, Maecker H, Leipold MD, Lin DTS, Kobor MS, Horvath S. Reversal of epigenetic aging and immunosenescent

trends in humans. Aging Cell. 2019 Dec;18(6):e13028. doi: 10.1111/acel.13028. Epub 2019 Sep 8. PMID: 31496122; PMCID: PMC6826138.
45. Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S. Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning. Aging (Albany NY). 2015 Dec;7(12):1198-211. doi: 10.18632/aging.100864. PMID: 26684672; PMCID: PMC4712342.
46. Yen RW, Vertino PM, Nelkin BD, Yu JJ, el-Deiry W, Cumaraswamy A et al (1992). Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. Nucleic Acids Res 20: 2287–2291.
47. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science (2009) 324(5929):930-5. Epub 2009/04/18. doi: 10.1126/science.1170116. PubMed PMID: 19372391; PubMed Central PMCID: PMCPMC2715015.
48. Aapola U, Kawasaki K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, Heino M et al (2000). Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. Genomics 65:293–298
49. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW et al (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. Gene 236: 87–95.
50. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. J Biol Chem 279: 48350–48359.
51. Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. Proc Natl Acad Sci USA 102: 8905–8909.
52. Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell 69: 915–926.
53. Jackson-Grusby L, Beard C, Possemato R, Tudor M, Fambrough D, Csankovszki G et al (2001). Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. Nat Genet 27: 31–39.
54. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell 99: 247–257.
55. Casillas Jr MA, Lopatina N, Andrews LG, Tollefsbol TO. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. Mol Cell Biochem. 2003;252:33–43.
56. Lopatina N, Haskell JF, Andrews LG, Poole JC, Saldanha S, Tollefsbol T. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. J Cell Biochem. 2002;84:324–34.
57. Liu L, van Groen T, Kadish I, Li Y, Wang D, James SR, et al. Insufficient DNA methylation affects healthy aging and promotes age-related health problems. Clin Epigenetics. 2011;2:349–60.
58. Armstrong VL, Rakoczy S, Rojanathammanee L, Brown-Borg HM. Expression of DNA methyltransferases is influenced by growth hormone in the long-living Ames dwarf

mouse in vivo and in vitro. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2014;69(8):923-933. doi:10.1093/gerona/glt133.
59. Garcia JM, Merriam GR, Kargi AY. Endotext [internet]. Massachusetts MDText.com. Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors; 2019. Growth hormone in aging. [Consultado 28/01/2021] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279163/
60. Cedar H, Bergman Y. Programming of DNA methylation patterns. Annu Rev Biochem. 2012;81:97–117.
61. Tan L, Shi YG. Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. Development. 2012;139:1895–902.
62. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. Nature (2010) 466(7310):1129-33. Epub 2010/07/20. doi: 10.1038/nature09303. PubMed PMID: 20639862; PubMed Central PMCID: PMCPMC3491567.
63. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosineand 5-Carboxylcytosine. Science (2011) 333:1300-3
64. Zhang H, Zhang X, Clark E, Mulcahey M, Huang S, Shi YG. 2010.TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. Cell Res 20: 1390–1393.
65. Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. Genes Dev. 2016 Apr 1;30(7):733-50
66. Hu L, Li Z, Cheng J, Rao Q, Gong W, Liu M, Shi YG, Zhu J, Wang P, Xu Y. Crystal structure of TET2-DNA complex: insight into TET-mediated 5mC oxidation. Cell. 2013 Dec 19;155(7):1545-55. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.020. Epub 2013 Dec 5. PMID: 24315485.
67. He C, Sidoli S, Warneford-Thomson R, Tatomer DC, Wilusz JE, Garcia BA, Bonasio R. High-Resolution Mapping of RNA-Binding Regions in the Nuclear Proteome of Embryonic Stem Cells. Mol Cell. 2016 Oct 20;64(2):416-430. doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.034. PMID: 27768875; PMCID: PMC5222606.
68. Fu L, Guerrero CR, Zhong N, Amato NJ, Liu Y, Liu S, Cai Q, Ji D, Jin SG, Niedernhofer LJ, Pfeifer GP, Xu GL, Wang Y. Tet-mediated formation of 5-hydroxymethylcytosine in RNA. J Am Chem Soc. 2014 Aug 20;136(33):11582-5. doi: 10.1021/ja505305z. Epub 2014 Aug 7. PMID: 25073028; PMCID: PMC4140497.
69. Guallar D, Bi X, Pardavila JA, Huang X, Saenz C, Shi X, Zhou H, Faiola F, Ding J, Haruehanroengra P, Yang F, Li D, Sanchez-Priego C, Saunders A, Pan F, Valdes VJ, Kelley K, Blanco MG, Chen L, Wang H, Sheng J, Xu M, Fidalgo M, Shen X, Wang J. RNA-dependent chromatin targeting of TET2 for endogenous retrovirus control in pluripotent stem cells. Nat Genet. 2018 Mar;50(3):443-451. doi: 10.1038/s41588-018-0060-9. Epub 2018 Feb 26. PMID: 29483655; PMCID: PMC5862756.
70. Zhu P, Guo H, Ren Y, Hou Y, Dong J, Li R, Lian Y, Fan X, Hu B, Gao Y, Wang X, Wei Y, Liu P, Yan J, Ren X, Yuan P, Yuan Y, Yan Z, Wen L, Yan L, Qiao J, Tang F. Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. Nat Genet. 2018 Jan;50(1):12-19. doi: 10.1038/s41588-017-0007-6. Epub 2017 Dec 18. PMID: 29255258.

71. Fulka H, Mrazek M, Tepla O, Fulka J Jr. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. Reproduction. 2004 Dec;128(6):703-8. doi: 10.1530/rep.1.00217. PMID: 15579587.
72. Tang F, Barbacioru C, Bao S, et al. Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. Cell Stem Cell. 2010;6(5):468-478. doi:10.1016/j.stem.2010.03.015
73. Greenberg MVC, Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019 Oct;20(10):590-607. doi: 10.1038/s41580-019-0159-6. Epub 2019 Aug 9. PMID: 31399642.
74. Hu, L., Lu, J., Cheng, J. et al. Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. Nature 527, 118–122 (2015). https://doi.org/10.1038/nature15713
75. K.E. Szulwach, X. Li, Y. Li, C.X. Song, H. Wu, Q. Dai, H. Irier, A.K. Upadhyay, M.Gearing, A.I. Levey, et al., 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging, Nat. Neurosci. 14 (2011) 1607–1616.
76. Mellén M, Ayata P, Dewell S, Kriaucionis S, Heintz N. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. Cell. 2012 Dec 21;151(7):1417-30. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.022. PMID: 23260135; PMCID: PMC3653293.
77. Cheng Y, Xie N, Jin P, Wang T. DNA methylation and hydroxymethylation in stem cells. Cell Biochem Funct. 2015;33(4):161-173. doi:10.1002/cbf.3101
78. Munzel, M., Globisch, D., Bruckl, T., Wagner, M., Welzmiller, V., Michalakis, S. et al. (2010). Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 49, 5375–5377. doi: 10.1002/anie.201002033
79. Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. Science. 2009;324(5929):929-930. doi:10.1126/science.1169786
80. Zhang, R. R. et al. Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition. Cell Stem Cell 13, 237–245 (2013).
81. Rudenko, A. et al. Tet1 is critical for neuronal activity-regulated gene expression and memory extinction. Neuron 79, 1109–1122 (2013).
82. Yu, H. et al. Tet3 regulates synaptic transmission and homeostatic plasticity via DNA oxidation and repair. Nat.Neurosci. 18, 836–843 (2015).
83. Zhu, X. et al. Role of Tet1/3 genes and chromatin remodeling genes in cerebellar circuit formation. Neuron 89, 100–112 (2016).
84. Mi Y, Gao X, Dai J, Ma Y, Xu L, Jin W. A Novel Function of TET2 in CNS: Sustaining Neuronal Survival. Int J Mol Sci. 2015;16(9):21846-21857. Published 2015 Sep 10. doi:10.3390/ijms160921846
85. Huang G, Liu L, Wang H, Gou M, Gong P, Tian C, Deng W, Yang J, Zhou TT, Xu GL, Liu L. Tet1 Deficiency Leads to Premature Reproductive Aging by Reducing Spermatogonia Stem Cells and Germ Cell Differentiation. iScience. 2020 Mar 27;23(3):100908. doi: 10.1016/j.isci.2020.100908. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32114381; PMCID: PMC7049665.
86. Jessop P, Toledo-Rodriguez M. Hippocampal TET1 and TET2 Expression and DNA Hydroxymethylation Are Affected by Physical Exercise in Aged Mice. Front Cell Dev

Biol. 2018 Apr 19;6:45. doi: 10.3389/fcell.2018.00045. PMID: 29732371; PMCID: PMC5922180.
87. Gilbert SF. Developmental Biology. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9983/
88. 7. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 1961;25:585–621.
89. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. Science. 1998 Jan 16; 279(5349):349-52.
90. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic Ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell. 1997;88:593–602.
91. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. Nature. 2014;509(7501):439-446. doi:10.1038/nature13193
92. Lowe R, Overhoff MG, Ramagopalan SV, et al. The senescent methylome and its relationship with cancer, ageing and germline genetic variation in humans. Genome Biol. 2015;16(1):194. Published 2015 Sep 17. doi:10.1186/s13059-015-0748-4
93. Maser, R. S., and R. A. DePinho. 2002. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. Science 297:565-569. [PubMed] [Google Scholar]
94. Sulkes SB.Manual MSD, versión para profesionales [internet]. Kenilworth, NJ., USA Merck Sharp & Dohme Corp., una subsidiaria de Merck & Co., Inc. 2020. Rett syndrome. 2018. Disponible en: https://www.msdmanuals.com/professional/pediatrics/learning-and-developmental-disorders/rett-syndrome
95. Klein CJ et al.DNMT1 mutation hot spot causes varied phenotypes of HSAN1 with dementia and hearing loss. Neurology. 2013 Feb 26;80(9):824-8.
96. Klein CJ. National Organization for Rare Disorders. Danbury. 2017. Disponibel en: https://rarediseases.org/rare-diseases/hereditary-sensory-autonomic-neuropathy-type-1e/
97. Lopez, V., Fernandez, A.F., Fraga, M.F.,The role of 5-hydroxymethylcytosine in development, aging and age-related diseases, Ageing Research Reviews (2017)
98. Wagner M, Steinbacher J, Kraus TF, et al. Age-dependent levels of 5-methyl-, 5-hydroxymethyl-, and 5-formylcytosine in human and mouse brain tissues. Angew Chem Int Ed Engl. 2015;54(42):12511-12514. doi:10.1002/anie.201502722
99. Song CX, Szulwach KE, Fu Y, et al. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. Nat Biotechnol. 2011;29(1):68-72. doi:10.1038/nbt.1732
100. Bradley-Whitman MA, Lovell MA. Epigenetic changes in the progression of Alzheimer's disease. Mech Ageing Dev. 2013 Oct;134(10):486-95. doi: 10.1016/j.mad.2013.08.005. Epub 2013 Sep 3. PMID: 24012631; PMCID: PMC3857018.
101. Chen, H., Dzitoyeva, S., Manev, H., 2012. Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in the mouse hippocampus. Restor Neurol Neurosci 30, 237-245.

102. Fan X, Wheatley EG, Villeda SA. Mechanisms of Hippocampal Aging and the Potential for Rejuvenation. Annu Rev Neurosci. 2017 Jul 25;40:251-272. doi: 10.1146/annurev-neuro-072116-031357. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28441118.
103. Uhlén M et al., Tissue-based map of the human proteome. Science (2015) PubMed: 25613900 DOI: 10.1126/science.1260419
104. Chouliaras, L., Rutten, B.P., Kenis, G., Peerbooms, O., Visser, P.J., Verhey, F., van Os, J.,Steinbusch, H.W., van den Hove, D.L., 2010a. Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Prog. Neurobiol. 90, 498e510.
105. Morgan AR, Hamilton G, Turic D, Jehu L, Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Moskvina V, Brayne C, Rubinsztein DC, Lynch A, Lawlor B, Gill M, O'Donovan M, Powell J, Lovestone S, Williams J, Owen MJ. Association analysis of 528 intra-genic SNPs in a region of chromosome 10 linked to late onset Alzheimer's disease. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2008 Sep 5;147B(6):727-31. doi: 10.1002/ajmg.b.30670. PMID: 18163421.
106. Mastroeni, D., Chouliaras, L., Grover, A., Liang, W.S., Hauns, K., Rogers, J., Coleman, P.D., 2013. Reduced RAN expression and disrupted transport between cytoplasm and nucleus: a key event in Alzheimer's disease pathophysiology. PLoS One 8, e53349.
107. Fuso, A., Seminara, L., Cavallaro, R.A., D'Anselmi, F., Scarpa, S., 2005. S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. Mol Cell Neurosci 28, 195-204.
108. Wang, S.C., Oelze, B., Schumacher, A., 2008. Age-specific epigenetic drift in late-onset 1175 Alzheimer's disease. PLoS One 3, e2698.
109. Buscarlet M, Tessier A, Provost S, Mollica L, Busque L. Human blood cell levels of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) decline with age, partly related to acquired mutations in TET2. Exp Hematol. 2016 Nov;44(11):1072-1084. doi: 10.1016/j.exphem.2016.07.009. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27475703.
110. Garcia-Outeiral V, de la Parte C, Fidalgo M, Guallar D. The Complexity of TET2 Functions in Pluripotency and Development. Front Cell Dev Biol. 2021 Jan 18;8:630754. doi: 10.3389/fcell.2020.630754. PMID: 33537318; PMCID: PMC7848104.
111. Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. Nature. 2011 May 19;473(7347):398-402. doi: 10.1038/nature10008. Epub 2011 Apr 3. PMID: 21460836.
112. De la Vega, R. y Zambrano, A. Alzheimer [en línea]. Circunvalación del Hipocampo, octubre 2013 [Consulta: 31 de marzo de 2021]. Disponible en: https://www.hipocampo.org/alzheimer.asp.
113. Antunes C, Sousa N, Pinto L, Marques CJ. TET enzymes in neurophysiology and brain function. Neurosci Biobehav Rev. 2019 Jul;102:337-344. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.05.006. Epub 2019 May 9. PMID: 31078565.hor
114. 5xFAD; Alzforum 2019. [Internet] (n.d.). Consultado el 9/3/2021. Disponible en: http://www.alzforum.org/research-models/5xfad

115. Griñán-Ferré C, Izquierdo V, Otero E, et al. Environmental Enrichment Improves Cognitive Deficits, AD Hallmarks and Epigenetic Alterations Presented in 5xFAD Mouse Model. Front Cell Neurosci. 2018;12:224. Published 2018 Aug 15. doi:10.3389/fncel.2018.00224
116. Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, Boza-Serrano A. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. Front Cell Neurosci. 2018 Dec 18;12:488. doi: 10.3389/fncel.2018.00488. PMID: 30618635; PMCID: PMC6305407.
117. Carrillo-Jimenez A, Deniz Ö, Niklison-Chirou MV, Ruiz R, Bezerra-Salomão K, Stratoulias V, Amouroux R, Yip PK, Vilalta A, Cheray M, Scott-Egerton AM, Rivas E, Tayara K, García-Domínguez I, Garcia-Revilla J, Fernandez-Martin JC, Espinosa-Oliva AM, Shen X, St George-Hyslop P, Brown GC, Hajkova P, Joseph B, Venero JL, Branco MR, Burguillos MA. TET2 Regulates the Neuroinflammatory Response in Microglia. Cell Rep. 2019 Oct 15;29(3):697-713.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.013. PMID: 31618637.
118. Li L, Qiu Y, Miao M, Liu Z, Li W, Zhu Y, Wang Q. Reduction of Tet2 exacerbates early-stage Alzheimer's pathology and cognitive impairments in 2×Tg-AD mice. Hum Mol Genet. 2020 Jul 21;29(11):1833-1852. doi: 10.1093/hmg/ddz282. PMID: 31943063.
119. Li L, Miao M, Chen J, Liu Z, Li W, Qiu Y, Xu S, Wang Q. Role of Ten eleven translocation-2 (Tet2) in modulating neuronal morphology and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neurochem. 2020 Nov 9. doi: 10.1111/jnc.15234. Epub ahead of print. PMID: 33165916.
120. Coppieters N, Dieriks BV, Lill C, Faull RL, Curtis MA, Dragunow M. Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. Neurobiol Aging. 2014 Jun;35(6):1334-44. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.031. Epub 2013 Dec 4. PMID: 24387984.
121. Day JJ, Sweatt JD. Cognitive neuroepigenetics: a role for epigenetic mechanisms in learning and memory. Neurobiol Learn Mem. 2011 Jul;96(1):2-12. doi: 10.1016/j.nlm.2010.12.008. Epub 2010 Dec 30. PMID: 21195202; PMCID: PMC3111867.
122. Seung-Gi Jin, Xiwei Wu, Arthur X. Li, Gerd P. Pfeifer, Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain, Nucleic Acids Research, Volume 39, Issue 12, 1 July 2011, Pages 5015–5024, https://doi.org/10.1093/nar/gkr120
123. Wu J, Basha MR, Brock B, Cox DP, Cardozo-Pelaez F, McPherson CA, Harry J, Rice DC, Maloney B, Chen D, Lahiri DK, Zawia NH. Alzheimer's disease (AD)-like pathology in aged monkeys after infantile exposure to environmental metal lead (Pb): evidence for a developmental origin and environmental link for AD. J Neurosci. 2008 Jan 2;28(1):3-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4405-07.2008. PMID: 18171917; PMCID: PMC2486412.
124. Fuso A, Nicolia V, Pasqualato A, Fiorenza MT, Cavallaro RA, Scarpa S. Changes in Presenilin 1 gene methylation pattern in diet-induced B vitamin deficiency. Neurobiol Aging. 2011 Feb;32(2):187-99. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.02.013. Epub 2009 Mar 28. PMID: 19329227.

125. Lahiri, D., Maloney, B. & Zawia, N. The LEARn model: an epigenetic explanation for idiopathic neurobiological diseases. Mol Psychiatry 14, 992–1003 (2009). https://doi.org/10.1038/mp.2009.82
126. Cochran JN, Geier EG, Bonham LW, Newberry JS, Amaral MD, Thompson ML, Lasseigne BN, Karydas AM, Roberson ED, Cooper GM, Rabinovici GD, Miller BL, Myers RM, Yokoyama JS; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Non-coding and Loss-of-Function Coding Variants in TET2 are Associated with Multiple Neurodegenerative Diseases. Am J Hum Genet. 2020 May 7;106(5):632-645. doi: 10.1016/j.ajhg.2020.03.010. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32330418; PMCID: PMC7212268.
127. Holstege H, Hulsman M, van der Lee SJ, van den Akker EB. The Role of Age-Related Clonal Hematopoiesis in Genetic Sequencing Studies. Am J Hum Genet. 2020 Sep 3;107(3):575-576. doi: 10.1016/j.ajhg.2020.07.011. PMID: 32888507; PMCID: PMC7477003.
128. Xie, M., Lu, C., Wang, J. et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. Nat Med 20, 1472–1478 (2014). https://doi.org/10.1038/nm.3733
129. Hokama M, Oka S, Leon J, Ninomiya T, Honda H, Sasaki K, Iwaki T, Ohara T, Sasaki T, LaFerla FM, Kiyohara Y, Nakabeppu Y. Altered expression of diabetes-related genes in Alzheimer's disease brains: the Hisayama study. Cereb Cortex. 2014 Sep;24(9):2476-88. doi: 10.1093/cercor/bht101. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23595620; PMCID: PMC4128707.
130. Ninomiya T. Japanese Legacy Cohort Studies: The Hisayama Study. J Epidemiol. 2018;28(11):444-451. doi:10.2188/jea.JE20180150
131. Nestor, C., Ruzov, A., Meehan, R., Dunican, D., 2010. Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine and 5 hydroxymethylcytosine in DNA. Biotechniques 48, 317e319.
132. Nunomura A, Perry G. RNA and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Focus on microRNAs. Oxid Med Cell Longev. 2020;2020:2638130. Published 2020 Nov 30. doi:10.1155/2020/2638130
133. Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, Ávila J, Llorens-Martín M. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. Nat Med. 2019 Apr;25(4):554-560. doi: 10.1038/s41591-019-0375-9. Epub 2019 Mar 25. PMID: 30911133.