

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMPARACIÓN DE PATRONES DE METILACIÓN EN SANGRE EN  
NONAGENARIOS CON Y SIN DEMENCIA DE ALZHEIMER EN UNA POBLACIÓN  
COSTARRICENSE

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en  
Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con énfasis en  
Genética y Biología Molecular

MARIA CAROLINA COTO VÍLCHEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2019

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer en primer lugar a mis papás por todo el amor, comprensión y soporte que me han dado durante todo este proceso y durante toda mi formación. A mis hermanos por su compañía y apoyo siempre, gracias.

Agradezco también a mi comité asesor. A Ph.D. Gabriela Chavarría Soley y a MSc. Henriette Raventós Vorst por toda la colaboración y el apoyo. Gracias por permitirme aprender tanto de ustedes durante este tiempo. A Ph.D. Alejandro Leal Esquivel, gracias por sus valiosos aportes para el desarrollo de esta investigación.

A Lara Mora Villalobos, gracias por su colaboración y por tanto aprendizaje. A Daniela Ugalde Araya, gracias por su apoyo incondicional durante tantos años. Agradezco también al resto del grupo de investigación en Psiquiatría Genética del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) gracias por sus aportes y apoyo durante la elaboración de este trabajo.

A Ph.D. Humberto Nicolini Sánchez, Ph.D. Alma Genis Mendoza y MSc. Jaime Martínez Magaña del Instituto Nacional de Medicina Genómica de México (INMEGEN) muchas gracias recibirme en su grupo de investigación y por sus aportes en cuanto al diseño experimental, obtención y análisis de los datos. Al resto del personal del INMEGEN que fue parte de esta investigación y de mi estadía allá, muchas gracias.

A todos quienes de una u otra forma han formado parte de mi formación académica, mi agradecimiento.

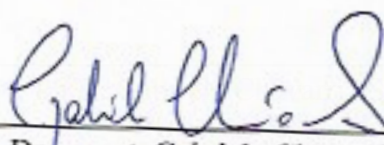
A la Universidad de Costa Rica (UCR), el Sistema de Estudios en Posgrado, al CIBCM y al INMEGEN, gracias por hacer posible este trabajo.

“Esta tesis fue aceptada por Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología,  
como requisito parcial para optar por el grado de Maestría Académica en Biología con  
énfasis en Genética y Biología Molecular”



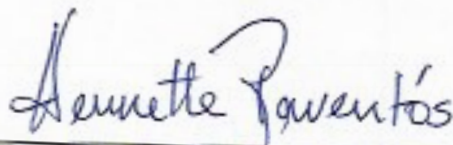
---

Dr. rer. nat. Gustavo Gutiérrez Espeleta  
Representante del Decano Sistema de Estudios de Posgrado



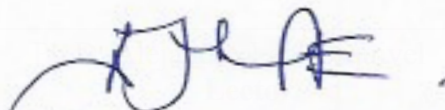
---

Dr. rer. nat. Gabriela Chavarría Soley  
Directora de Tesis



---

M.Sc. Henriette Raventós Vorst  
Lectora



---

Dr. rer. nat. Alejandro Leal Esquivel  
Lector



---

Dr. rer. nat. Jorge Arturo Lobo Segura  
Representante del Director del Posgrado en Biología



---

Maria Carolina Coto Vilchez  
Postulante

## Tabla de contenidos

Resumen .....	v
Lista de cuadros .....	vi
Introducción.....	1
Metodología.....	10
Objetivo General: .....	14
Objetivos Específicos:.....	14
Artículo: Comparative whole genome DNA methylation profiling in Costa Rican nonagenarians with and without dementia: significant difference between chronological and epigenetic age and further evidence for a role of PM20D1 .....	15
Conclusiones .....	34
Referencias bibliográficas .....	35

## Resumen

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno complejo que resulta de una combinación de factores de riesgo genéticos y no genéticos. Existen variantes genéticas que pueden proteger contra el desarrollo de la demencia de Alzheimer en edades avanzadas. La mayoría de los estudios epigenéticos y no epigenéticos del envejecimiento cognitivo exitoso se han centrado en individuos con y sin demencia en el rango de edad 65-85, pero hay menos información sobre los marcadores epigenéticos del envejecimiento cognitivo normal. En este estudio, se comparan los perfiles de metilación del ADN de sangre total de los nonagenarios costarricenses, cognitivamente sanos y con demencia utilizando el Infinity MethylationEPIC BeadChip. Se calculó la edad epigenética de los participantes utilizando el reloj epigenético de Horvath. En promedio, la edad epigenética fue de 73 años en ambos grupos, lo que representa una diferencia de 23 años entre la edad epigenética y la edad cronológica en el caso de personas cognitivamente sanas y de 22 años en el caso de personas con demencia. Se identificaron las regiones diferencialmente metiladas entre ambos grupos. El análisis reveló 11 regiones diferencialmente metiladas entre grupos, que contienen cinco genes y dos pseudogenes. Estos genes están involucrados en la regulación del ciclo celular, la embriogénesis, la síntesis de ceramidas y la migración de interneuronas a la corteza cerebral. Uno de los cinco genes diferencialmente metilados es *PM20D1*, el cual ha sido encontrado asociado a AD en estudios anteriores, y es un QTL tanto para la expresión como para la metilación.

## Lista de cuadros

Cuadro 1. Principales genes que presentan un estado alterado de metilación en la demencia de Alzheimer.....9

Table 1. Differentially methylated genomic regions between non demented and demented.....33



**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo,           Maria Carolina Coto Vilchez          , con cédula de identidad           115570216          , en mi condición de autor del TFG titulado           Comparación de patrones de metilación en nonagenarios           con y sin demencia de Alzheimer en una población costarricense.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:**

Nombre Completo:           Maria Carolina Coto Vilchez          .

Número de Carné:           B12111           Número de cédula:           115570216          .

Correo Electrónico:           ccotovilchez@gmail.com          .

Fecha:           6 de febrero 2020           . Número de teléfono:           83164463          .

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a):           Gabriela Chavarría Soley          .

  
**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## **Introducción**

La demencia de Alzheimer se reportó por primera vez por Alois Alzheimer en el año 1907, pero fue hasta 70 años después que se reconoció como la principal causa de demencia en edades avanzadas así como causa importante de muerte (Katzman, 2008). Se estima que en el mundo hay 26 millones de personas con la enfermedad (Brookmeyer et al., 2007).

Actualmente no se conoce cuantas personas tienen demencia de Alzheimer en Costa Rica. En el país, la Clínica de la Memoria del Hospital Nacional de Geriatria y Gerontología Raúl Blanco Cervantes es la encargada de atender a la población adulta mayor con enfermedades mentales desde febrero del 2007. Desde sus inicios hasta el 2014 el 47.1% de la población atendida fue diagnosticada con demencia de Alzheimer (Miranda-Valverde et al., 2014). Costa Rica es un país que se encuentra en un claro proceso de senescencia poblacional, donde aproximadamente un 10% de la población está compuesta por personas adultas mayores. En el país, la esperanza de vida al nacer es de 78 años, por lo que se ha ubicado como uno de los países con mayor longevidad en América, solo superado por Canadá (Rosero-Bixby & Dow, 2009). A una edad de 90 años, los nonagenarios del país tienen una esperanza de vida de 4.4 años lo cual es medio año más que en cualquier otro país del mundo (Rosero-Bixby, 2008). Es de destacar que Costa Rica cuenta con una de las regiones de mayor longevidad en todo el mundo en el cantón de Nicoya (Buettner, 2012).

### **Cuadro clínico y hallazgos anatomopatológicos**

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Alzheimer varían entre individuos. Sin embargo, la manifestación clínica inicial más común es una reducción gradual en la capacidad de recordar nueva información, que se asocia con una reducción en las neuronas en las regiones cerebrales involucradas en la formación de memoria reciente (Alzheimer's Association, 2016).

Esta enfermedad se caracteriza por tres cambios anormales en el cerebro. El primero de ellos es que los giros o circunvoluciones cerebrales se estrechan, se da una ampliación de los surcos, se reduce el peso del cerebro y se da una dilatación de los ventrículos. La



segunda característica de la enfermedad es la producción, acumulación y oligomerización de proteína beta amiloide, formando placas amiloides extracelulares en el cerebro. Estos depósitos extracelulares se encuentran alrededor de axones y dendritas; estas últimas presentan engrosamientos en las neuronas de personas con la enfermedad. La tercera característica observada en pacientes con Alzheimer es la acumulación de ovillos neurofibrilares, los cuales son inclusiones filamentosas en los cuerpos celulares y dendritas de la proteína tau (Hudspeth et al., 2013).

El desarrollo de una clasificación para las enfermedades neuropsiquiátricas en categorías etiológicas precisas ha sido complejo, porque varias entidades comparten hallazgos clínicos y patológicos. Por ejemplo, teniendo en cuenta las características patológicas clásicas, se observa que las placas amiloides, que son una de las principales características de la enfermedad de Alzheimer, también son frecuentes en la demencia con cuerpos de Lewy y la aparición temprana del perfil neurodegenerativo similar a Alzheimer se ha observado también en el síndrome de Down (Arai, Lee, Hill, Greenberg & Trojanowski 1992).

El diagnóstico definitivo de la demencia de Alzheimer se puede realizar solamente post mortem. Clínicamente, se puede hacer un diagnóstico probable, para lo cual se realiza un historial detallado del desarrollo de los síntomas para determinar si existe deterioro cognitivo del individuo y si se han afectado sus funciones sociales u ocupacionales. Esta información se toma del individuo afectado y de una persona cercana al mismo. Además se realizan pruebas cognitivas y exámenes físicos y neurológicos. Por otro lado, se realizan exámenes de sangre y de imágenes cerebrales para descartar otras causas de deterioro cognitivo como la presencia de un tumor o alguna deficiencia vitamínica (Hudspeth et al., 2013; Ballard et al., 2011; Alzheimer's Association 2016).

### **Factores de riesgo**

El principal factor de riesgo asociado a la demencia de Alzheimer es la edad avanzada. Entre un 1% y 5% de los casos de Alzheimer se dan en personas con menos de 65 años (Reitz, Brayne & Mayeux, 2011). Diversos estudios en diferentes poblaciones han encontrado que en edades entre 60 y 70 años, la enfermedad tiene una prevalencia de entre

1% y 3%, de entre 3% y 12% en personas entre 70 y 80 años y de entre 25% y 35% en personas con más de 85 años (Hudspeth et al., 2013, Mayeux & Stern, 2012).

La enfermedad de Alzheimer se considera un trastorno complejo. Una enfermedad compleja se da por la combinación de muchos factores tanto ambientales como genéticos. En el caso de la genética, existen unos pocos genes cuyas variantes tienen un efecto mayor en la aparición de la enfermedad, pero en la gran mayoría de los casos las variantes genéticas que contribuyen al riesgo tienen un efecto menor. Se conocen tres genes cuyas variantes se caracterizan de efecto mayor: *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*. El gen *APP* codifica para la proteína precursora amiloidea (APP), la cual es una proteína de membrana que es cortada por secretasas para formar distintas proteínas, entre ellas, la beta amiloide (Goate et al., 1991). *PSEN1* y *PSEN2* codifican para proteínas que son la subunidad catalítica de un tipo de secretasa que participa en el procesamiento de APP (Schellenberg et al., 1992; Levy-Lahad et al., 1995). Por lo tanto, variantes en estos genes causan una acumulación de péptidos derivados de la proteína APP en el cerebro de las personas, lo que lleva al desarrollo de la demencia de Alzheimer (Shen & Kelleher, 2007).

También se han descrito otros polimorfismos de efecto moderado o menor que resultan en alteraciones en la función génica y que pueden explicar algunos rasgos de las enfermedades relacionados con la edad (Kim, Kim & Issa, 2009). Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer el factor de riesgo genético más prevalente es la presencia del alelo ApoE4 del gen de ApoE; las personas con el alelo ApoE4 tienen mayor riesgo de tener la enfermedad de Alzheimer. Diversos estudios han descrito la frecuencia de este alelo en distintas poblaciones, con valores de 6-15% en personas no afectadas por demencia y de 30-50% en personas con Alzheimer (Corder et al., 1993; Singh, Singh & Mastana 2006; Bang et al., 2003; Hudspeth et al., 2013). Sin embargo, se ha visto en algunas poblaciones que esta asociación disminuye gradualmente con la edad. Se ha planteado la hipótesis de que esto se puede deber a que a pesar de que el alelo es un factor de riesgo tanto para mortalidad como para demencia, existe un grupo que tiene protección contra esta. A edades avanzadas, aumenta la proporción de supervivientes protegidos entre los que permanecen libres de demencia (Valerio et al., 2014; Miech et al., 2002; Farrer et al., 1997).

Estudios de asociación de todo el genoma (GWAS, por sus siglas en inglés) han encontrado regiones que se asocian a la demencia del Alzheimer, en distintas poblaciones pero principalmente en población caucásica. Dentro de estas regiones, se han identificado genes cuyos productos participan en procesos que pueden estar relacionados con la patología de la enfermedad como por ejemplo: respuesta inmune (*CD33*, *ABCA7*, *CD2AP*, *HLA-DRB5/DRB1*, *INPP5D*, *MEF2C*), procesamiento de la proteína APP (*SORLI*, *CASS4*), procesamiento de la proteína tau (*CASS4*, *FERMT2*), función sináptica (*MEF2C*) migración celular (*PTK2B*) y transporte de lípidos y endocitosis (*SORLI*) (Hollingworth et al., 2011; Nai et al., 2011; Lambert et al., 2013; Akhtar et al., 2012; Reitz & Mayeux 2014). Por otro lado, la asociación con los genes *CELF1*, *NME8* y *CASS4* sugiere que los procesos relacionados con el citoesqueleto y transporte axonal podrían ser relevantes en la patología del Alzheimer (Lambert et al., 2013).

Existen enfermedades que representan un factor de riesgo para la demencia de Alzheimer. Una de ellas es la enfermedad cerebrovascular que trae como consecuencia infartos isquémicos, infartos hemorrágicos, vasculopatías y cambios en la materia blanca cerebral que causan lesiones en regiones cerebrales que son importantes en los procesos de memoria. Además, estos infartos favorecen la acumulación de proteína beta amiloide lo que causa un declive cognitivo (Esiri et al., 1999; Lee et al., 2014). Existe evidencia que la hipertensión arterial puede aumentar el riesgo de desarrollar Alzheimer ya que afecta la integridad de la barrera hematoencefálica. Esto puede resultar en la extravasación de proteínas al tejido cerebral, lo cual puede causar daño celular, reducción en la eficacia de la transmisión sináptica, apoptosis y al igual que la enfermedad cerebrovascular, acumulación de proteína beta amiloide (Kalaria 1992; Farrall & Wardlaw, 2009; Blennow et al., 1990).

Por otro lado, existen otros factores de riesgo para la demencia de Alzheimer que son modificables al variar los hábitos de vida, es decir, son relevantes en el contexto de la prevención. Se ha encontrado evidencia que sugiere que factores como el fumado, el nivel educativo y la dieta juegan un rol en la enfermedad (Norton et al., 2014). Diversos estudios han encontrado que la actividad física está asociada con una reducción en el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (Scarmeas et al., 2009). Se ha encontrado que el ejercicio promueve el aprendizaje en animales jóvenes y de edades avanzadas por medio de la activación de mecanismos de plasticidad cerebral y de circuitos neuronales, además,

aumenta la sobrevivencia neuronal y estimula la neurogénesis (van Praag et al., 1999; Cotman & Berchtold, 2002).

La evidencia indica que personas jóvenes y de edades avanzadas que realizan actividad de estimulación cognitiva como estudiar, leer y jugar son menos propensas a desarrollar demencia que quienes no (Fratiglioni, Paillard-Borg & Winblad, 2004). También existe evidencia sobre el rol que tiene el nivel de escolaridad de una persona en el declive cognitivo relacionado con la edad; se ha encontrado un menor declive en personas con un alto nivel educativo (Chodosh et al., 2002).

Algunos estudios han determinado que la depresión puede ser un factor de riesgo para la demencia de Alzheimer, sin embargo, aún no existe claridad al respecto. Green y colaboradores (2003) realizaron un estudio para elucidar la asociación entre la depresión y la demencia, y concluyeron que, si el Alzheimer aparece aproximadamente en el mismo año que inició la depresión, es un síntoma de la demencia. Si la depresión se da años antes, sí se considera un factor de riesgo para el Alzheimer. Sin embargo, esta información es difícil de interpretar.

### **Epigenética y Alzheimer**

La epigenética se refiere a cambios en la expresión de genes que son estables entre divisiones celulares, pero que no involucran cambios en la secuencia de ADN (Allis et al., 2006). Estas alteraciones pueden darse por la exposición ambiental a factores nutricionales, químicos y físicos los cuales pueden alterar el fenotipo (Kovalchuk, 2008). Mediante estos mecanismos epigenéticos, es posible modular procesos como unión de factores de transcripción, expresión génica y procesos de editaje; además, es posible regular la expresión específica de tejido (Mazzio & Soliman, 2012). Existen diversas modificaciones epigenéticas como la metilación del ADN, las modificaciones post traduccionales de las proteínas histonas, la remodelación de la cromatina por medio de complejos proteicos y la modulación por medio de ARN no codificantes (Jaenisch & Bird 2003; Kouzarides 2007; Mercer & Mattick 2013).

La modificación epigenética más estudiada es la metilación del ADN, en el cual se adiciona un grupo metilo en el carbono 5 de una molécula de un residuo de citosina en el

ADN, resultando una 5-metilcitosina (m5C) (Bird, 1985). En las células se dan dos procesos de metilación diferentes: *de novo*, que establece estados de metilación nuevos, y la de mantenimiento, que copia los patrones de metilación en células hijas luego de la replicación del ADN (Bestor, 2000).

En general, la metilación del ADN en las regiones de promotores se asocia principalmente al silenciamiento de genes (Nakao, 2001). En el genoma de los seres humanos existen regiones donde la frecuencia de CG es muy abundante, conocidas como islas CpG (Chatterjee & Vinson, 2012). Las islas CpG se encuentran comúnmente asociadas a genes, principalmente en los promotores y en los primeros exones; sin embargo, también se encuentran en regiones hacia el extremo 3' (Larsen et al., 1992). Usualmente, tanto el promotor del gen como el sitio del inicio de la transcripción están incluidos dentro de la isla CpG y la expresión de ese gen está reprimida cuando esa región se encuentra hipermetilada, de aquí el efecto de silenciamiento que produce esta marca epigenética (Nakao, 2001).

La metilación de ADN en promotores y el silenciamiento de genes asociado, es el cambio epigenético que más se ha estudiado en las enfermedades asociadas a la edad (Kim et al., 2009). En general, se ha observado una disminución en la metilación del ADN a nivel de todo el genoma, aunque acompañada de una hipermetilación localizada en algunos promotores específicos a edades avanzadas (Marques et al., 2011). En cuanto a los procesos cerebrales, las alteraciones epigenéticas parecen tener un rol clave en un amplio ámbito de funciones como los mecanismos de aprendizaje y memoria, adicción a drogas, neurodegeneración y ciclos circadianos. Además, se han encontrado alteraciones epigenéticas en enfermedades como Síndrome del X frágil, Síndrome de Rett, enfermedad de Huntington, esquizofrenia y trastorno bipolar, enfermedad de Alzheimer, entre muchas otras (Jiang et al., 2008).

Las modificaciones epigenéticas podrían participar en la etiología de los trastornos multifactoriales como la enfermedad de Alzheimer y el Parkinson. En estas enfermedades se ha encontrado discordancia entre gemelos idénticos tanto para el diagnóstico de la enfermedad como para la edad de inicio, por lo que se ha sugerido que la metilación

diferencial podría estar asociada a los fenotipos discordantes entre ellos (Fraga et al., 2005; Gatz et al., 2006; Nee & Lippa, 1999).

Como se mencionó anteriormente, se han realizado estudios en los cuales se evidencia que la aparición de la demencia de Alzheimer está asociada a factores ambientales como la dieta y el estilo de vida, entre otros, donde la epigenética podría ser el mediador entre el componente ambiental y el genético (Chouliaras et al., 2010).

Con respecto a factores ambientales, se ha sugerido en estudios en animales que el ejercicio promueve la neurogénesis y la plasticidad sináptica. Se ha determinado que en animales la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) aumenta con el ejercicio y que esto podría estar involucrado en los efectos protectores de la actividad física en patologías como el Alzheimer, probablemente mediante mecanismos epigenéticos (Scarmeas et al., 2009; Dao et al., 2015).

A nivel general, un estudio encontró que en neuronas del tejido cortical postmortem de pacientes con Alzheimer, la inmunoreactividad de 5-metilcitosina (5mC) es mucho menor que en controles de una edad similar. Además, el nivel de 5mC se relaciona de forma inversamente proporcional con marcadores de ovillos neurofibrilares en las mismas neuronas, lo cual en conjunto implica que en el cerebro de personas con la enfermedad, se da una pérdida general de 5mc (Mastroeni et al., 2010).

Se ha reportado hipometilación del ADN en la corteza entorrinal de pacientes enfermos al compararse con controles. Esta región del cerebro es una de las primeras regiones del cerebro que se ve afectada en la demencia de Alzheimer (Maestroeni et al., 2010). Además, de acuerdo con la discordancia en la aparición de la enfermedad en gemelos monocigóticos mencionada anteriormente, se han encontrado diferencias en la metilación del ADN en neocorteza temporal de gemelos monocigóticos discordantes para la enfermedad. En un estudio, el individuo enfermo mostró menores niveles de inmunoreactividad de 5-metilcitosina, como un marcador de metilación, que su hermano gemelo sano (Maestroeni et al., 2009).

La proteína tau hiperfosforilada es responsable de la formación de ovillos neurofibrilares característicos en la demencia de Alzheimer. La hiperfosforilación de la proteína resulta en el auto ensamblaje de ovillos formando agregados que participan en la

patogénesis de la enfermedad. Se ha encontrado hipometilación en el promotor de tau con la edad, sin embargo, hay variaciones en el estado de metilación en los sitios de unión de factores de transcripción. Por ejemplo, hay hipometilación en los sitios de unión de GCF (factor granulocítico quimiotáctico), responsable de la represión de promotores ricos en GC, mientras que sitios de unión al activador transcripcional SP1 se encontraron hipermetilados. Estos cambios podrían representar un “doble hit” en la actividad transcripcional del gen tau, lo que causa una disminución en su actividad (Tohgi et al., 1999).

En pacientes con Alzheimer de inicio tardío se ha encontrado una hipermetilación en regiones con baja densidad de CpG del promotor de la apolipoproteína E-e4 que, como se mencionó anteriormente, es uno de los principales alelos de riesgo en la enfermedad. Esto se encontró en tejido de corteza prefrontal postmortem y en linfocitos periféricos en pacientes con Alzheimer en comparación con los controles (Wang et al., 2008). Por su parte, Hutnick y colaboradores (2009) encontraron que la eliminación de la ADN metil transferasa 1 (DNMT1) en cerebro murino provoca una hipometilación significativa del ADN en neuronas corticales y del hipocampo, lo cual resulta en neurodegeneración manifestada en déficit severos en aprendizaje y comportamiento relacionado con la memoria pero no en funciones motoras y coordinación.

En el Cuadro 1 se presenta una lista de los principales genes que se han encontrado diferencialmente metilados en individuos con demencia de Alzheimer al compararlos con individuos cognitivamente sanos.

Cuadro 1. Principales genes que presentan un estado alterado de metilación en la demencia de Alzheimer. Hipermet=Hipermetilado; Hipomet=Hipometilado

Gen	Estado de metilación en individuos afectados	Función/posible efecto	Tejido	Humano/ animales	Referencia
<i>PP2</i>	Hipomet	Enzima que fosforila y desfosforila a tau	Línea celular de neuroblastoma	Ratón	Sontag <i>et al.</i> 2007
<i>GSK38</i>	Hipomet	Involucrado en desarrollo neuronal y metabolismo energético	Línea celular de neuroblastoma	Humano	Nicolia <i>et al.</i> 2011
<i>APP</i>	Hipomet	Proteína precursora amiloidea	Corteza cerebral	Humano	Tohgi <i>et al.</i> 1999, Barrachina & Ferrer 2016
<i>PSEN1</i>	Hipomet	Componente de $\gamma$ -secretasa, la cual procesa a APP	Línea celular de neuroblastoma	Humano/ratón	Fuso <i>et al.</i> 2004, Barrachina & Ferrer 2016
<i>BACE1</i>	Hipomet	$\beta$ -secretasa que procesa a APP	Línea celular de neuroblastoma	Humano/ratón	Fuso <i>et al.</i> 2004, Fuso <i>et al.</i> 2008
<i>NEP</i>	Hipermet	Enzima que degrada proteína $\beta$ -amiloidea	Cultivo de células cerebrales endoteliales	Ratón	Chen <i>et al.</i> 2009
<i>SORL1</i>	Hipermet	Receptor disminuido en cerebro de personas con Alzheimer, se une a APOE	Hipocampo	Humano	Furuya <i>et al.</i> 2012
<i>APOE-<math>\epsilon</math>4</i>	Hipermet	Factor de riesgo para Alzheimer de inicio tardío	Corteza prefrontal	Humano	Wang, Oelze & Schumacher 2008
<i>BDNF</i>	Hipermet	Neurofina que al unirse con su receptor participa en la sobrevivencia neuronal en el cerebro adulto	Corteza prefrontal	Humano	Rao <i>et al.</i> 2012
<i>CREB</i>	Hipermet	Señalización por CREB participa en la plasticidad sináptica que media los procesos de memoria	Corteza prefrontal	Humano	Rao <i>et al.</i> 2012, Saura & Valero 2011
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	Hipomet	Factor de transcripción altamente expresado en el sistema nervioso, especialmente en terminaciones sinápticas	Corteza prefrontal	Humano	Rao <i>et al.</i> 2012
<i>SORBS3</i>	Hipermet	Codifica para un molécula de adhesión celular que se expresa en neuronas y glia	Tejido cerebral /corteza frontal	Humano/ratón	Sánchez-Mut <i>et al.</i> 2013
<i>ANK1</i>	Hipermet	Participa en procesos de proliferación celular, contacto celular	Corteza entorrinal	Humano	Lunnon <i>et al.</i> 2014



## **Reloj epigenético**

Existe evidencia de que hay marcas epigenéticas asociadas a la edad: genes o regiones genómicas se hipermetilan o hipometilan con la edad (Jung & Pfeifer, 2015). Se ha visto que la hipermetilación relacionada con la edad se da especialmente en islas CpG en promotores de genes importantes para el desarrollo (Horvath et al., 2012). A pesar de que se sabe que el perfil epigenómico varía entre tipos de tejidos, diversos estudios han demostrado que se dan marcas en sitios CpG independientemente del sexo y el tipo de tejido (Horvath, 2013). Hay diversos biomarcadores de la edad que se han descrito con el tiempo como por ejemplo la longitud de los telómeros, sin embargo, el reloj epigenético ha resultado ser uno de los más exactos (Jylhävä, Pedersen, & Hägg, 2017). El reloj epigenético de Horvath (2013) es un modelo matemático que predice la edad midiendo los niveles de metilación del ADN en diferentes sitios del genoma, que se desarrolló usando 8000 muestras de 82 distintos arreglos de metilación e incluye 51 tejidos sanos y tipos celulares. Esto permite predecir la edad independientemente del tejido que se esté usando (Horvath, 2013).

## **Metodología**

Este proyecto se realizó mediante un convenio entre la Universidad de Costa Rica y el Instituto de Medicina Genómica de México (INMEGEN). El proyecto fue aprobado por el comité ético-científico (CEC) de la Universidad de Costa Rica (UCR) y cumple con las normas éticas internacionales.

### **Selección de la muestra y diagnóstico**

La muestra se seleccionó del estudio “Fenotipos del proceso de envejecimiento cognitivo exitoso en la población fundadora de Costa Rica” que se realizó entre 2005 y 2016, aprobado por el CEC de la UCR. Está compuesta por nonagenarios provenientes del Valle Central de Costa Rica. Los participantes fueron referidos por médicos de la Asociación Costarricense de Médicos Especialistas en Geriatría. Una vez contactados y posterior a la firma del consentimiento informado, fueron evaluados por un único geriatra y

clasificados como con o sin demencia y deterioro cognitivo, con base en la Clasificación Clínica de Demencia (CDR por sus siglas en inglés), el Mini-Examen del Estado Mental (MMSE por sus siglas en inglés) y el historial clínico.

La prueba CDR evalúa memoria, orientación, juicio, resolución de problemas, cuidado personal y pasatiempos. La información se obtiene tanto del paciente como de una persona cercana al mismo y la puntuación va de 0 a 3 (Morris 1997). De acuerdo con la prueba CDR, se catalogaron sin demencia a las personas que obtuvieron un puntaje de cero, con deterioro cognitivo moderado a las personas con un valor de 2 y con deterioro severo a quienes obtuvieron un valor de 3.

El MMSE es una prueba corta muy usada para el seguimiento clínico de la demencia. Se realizan preguntas para evaluar orientación, memoria inmediata, atención y cálculo, recuerdo diferido, y lenguaje y construcción. Una puntuación entre 27 y 30 indica ausencia de deterioro cognitivo y valores menores a 6 indican demencia severa (Folstein, Folstein & McHugh, 1975).

Se seleccionaron 32 individuos para el análisis de metiloma, 21 de ellos no afectados y 11 con la enfermedad. Como criterio de inclusión se tomó que las personas fueran mujeres, con una edad entre 90 y 103 años, con al menos un embarazo. La edad fue verificada por medio de la cédula de identidad. Se incluyeron personas con escolaridad entre 0 a 9 años y que fueran casadas o viudas. Además todas vivían con sus familiares. Otro aspecto tomado en cuenta en la selección de las muestras fue que la menopausia se presentara entre los 50 y los 55 años y que no hubieran recibido terapia de reemplazo hormonal con estrógenos. Con respecto al diagnóstico de estado cognitivo, en el grupo de personas con demencia se incluyeron a quienes tuvieron un valor de 3 en la prueba de CDR y de 0 a 6 en MMSE, mientras que en el grupo de mujeres sin demencia se incluyeron quienes tuvieron valores de 0 y 27-30, respectivamente. Se excluyeron personas con antecedentes de accidente cerebrovascular o presencia de alguna enfermedad que potencialmente cause otros tipos de demencia.

### **Extracción de ADN y metiloma**

Se tomó una muestra de aproximadamente 60 mililitros de sangre por venopunción periférica, de la cual se extrajo el ADN por el método de sacarosa (Cheung *et al.*, 1993). La

obtención del perfil epigenético se llevó a cabo por medio del chip Infinium Methylation EPIC (Illumina, Estados Unidos), que abarca aproximadamente 850 000 sitios de metilación a lo largo del genoma y abarca regiones enhancer, cuerpos de genes, promotores e islas CpG. El primer paso consiste en tratar el ADN con bisulfito usando el kit “Zymo EZ DNA Methylation” (Zymo Research, Estados Unidos). En este proceso, las citosinas no metiladas se convierten en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin ningún cambio. El siguiente paso es la amplificación del ADN tratado con bisulfito para lo cual se requiere la desnaturalización y neutralización de las muestras (Frommer *et al.*, 1992). Seguidamente, el ADN ya desnaturalizado se amplifica isotérmicamente durante toda una noche, de esta forma se amplifica todo el genoma, es decir, todas las regiones se amplifican de manera homogénea (Hosono, 2003). Después es necesario realizar una fragmentación del producto amplificado por medio de enzimas; este proceso se da basándose en un punto final para prevenir la sobrefragmentación de la muestra a analizar (Illumina 2015). Una vez fragmentado el ADN, se debe realizar una precipitación con isopropanol, seguido de una centrifugación a 4°C para colectar todo el material. Luego se debe resuspender el ADN precipitado en un búfer de hibridación (Illumina 2015).

Para la hibridación, se debe dispensar el ADN ya fragmentado y resuspendido en el chip e incubarlo en el “Illumina hybridization oven” durante una noche. Los fragmentos de ADN se unen a una posición específica de locus. Luego de esto se realiza un lavado donde el ADN no hibridado, o hibridado inespecíficamente se elimina y así el chip se tiene listo para la tinción y extensión. Cuando el ADN se encuentra hibridado en el chip, se da una extensión de una sola base usando el capturado como templete y se incorporan sondas para determinar el genotipo de cada una de las posiciones. Finalmente, un sistema de escaneo (Illumina iSan System o BeadArray Reader) usa un láser para excitar el fluoróforo de cada posición del chip, de esta forma el escáner genera una imagen de alta resolución de la luz emitida por los fluoróforos (Illumina 2015).

La proporción de metilación del ADN en un sitio CpG particular se conoce como valor beta de metilación ( $\beta$ ) y se calcula tomando la proporción de la señal de metilación (C) y de la señal de no metilación (T) por medio de la siguiente fórmula:  $\beta = \frac{\text{intensidad de la señal de metilación}}{\text{intensidad de la señal de no metilación} + \text{intensidad de la señal de metilación} + 100}$ . De esta forma, un valor de  $\beta$  de 0 se interpreta como que ese sitio CpG se

encuentra completamente desmetilado y un valor de 1 significa que el sitio está completamente metilado (Bibikova et al., 2011). Estos valores de  $\beta$  junto con el valor de  $p$  asociado son generados por el sistema de escaneo (Illumina 2015). El trabajo de laboratorio para la obtención del perfil de metilación de los individuos fue llevado a cabo en las instalaciones del INMEGEN en la Ciudad de México.

Para el análisis estadístico se usó el programa R, específicamente el paquete minfi (Aryee et al., 2014). Se realizó el control de calidad para detectar si existió algún fallo en el proceso para alguna de las muestras. Seguidamente se realizó el filtrado de sondas que puedan afectar los resultados como aquellas que pueden hibridar en varios sitios. Además, se eliminaron las sondas que corresponden a secuencias donde se encuentran SNPs conocidos; esto se hace debido a que en caso de no eliminarlos, no habría claridad de si las diferencias en señales se deben a una diferencia real en metilación o a una diferencia en la secuencia genética que provocara que la sonda se uniera de forma diferente en algunos individuos. Adicionalmente, se eliminaron las sondas cuya intensidad no es estadísticamente significativa a la intensidad de fondo del microarreglo, así como las sondas que fallaron en más de un 50% de las muestras (Wright et al., 2016). Por último, se realizó la normalización de FunNorm con el fin de eliminar la variación no deseada lo cual se controla por medio de la variabilidad de las sondas control que se encuentran en el microarreglo (Fortin et al., 2014).

Como parte del análisis de los datos, se calculan las proporciones celulares de las muestras donde se incluyen los linfocitos CD8+ T y CD4+ T, células NK, células B, monocitos y granulocitos. Esto se hace usando el algoritmo de Houseman (Houseman et al., 2012). Adicionalmente, se usó el programa R para el cálculo de la predicción de edad de metilación según el reloj epigenético de Horvath. El método parte de la metilación de 353 sitios CpG que es usada para el cálculo de la edad de metilación usando una función de calibración (Horvath, 2013). Para evaluar la correlación en el grado de metilación entre cerebro y sangre de los genes diferencialmente metilados entre personas con y sin demencia, se usó la herramienta computacional BECon la cual indica la correlación por sitio CpG usando una base datos de metilación de ADN en muestras pareadas de sangre y de tres regiones de cerebro postmortem (Edgar et al., 2017).

Para la determinación de las regiones diferencialmente metiladas entre ambos grupos se usaron dos metodologías: DMRcate and ChAMP-Bumphunter, los cuales utilizan un algoritmo matemático diferente (Peters et al., 2016; Morris et al., 2013). Para ambos métodos se utilizó un valor de significancia de 0.05 como límite para determinar las regiones a incluir en el análisis. El resultado de ambas metodologías indica la posición genómica inicial y final de cada una de las regiones diferencialmente metiladas, tomando como referencia la versión hg19 del genoma humano. Se compararon las regiones encontradas y se escogieron aquellas que fueron encontradas en común por ambos programas. Después de obtener las regiones, se realizó una búsqueda de las mismas en el UCSC Genome Browser, para identificar cuales genes se encuentran en dichas regiones. Seguidamente se realizó un revisión bibliográfica sobre las funciones de los genes, así como sobre el eventual rol de ellos en la patología de la demencia de Alzheimer.

### **Objetivo General:**

Determinar si existen diferencias en los perfiles de metilación en sangre entre personas nonagenarias costarricenses con y sin demencia de Alzheimer a lo largo de todo el genoma

### **Objetivos Específicos:**

1. Identificar los patrones de metilación a lo largo de todo el genoma en un grupo de nonagenarios con y otro sin demencia de Alzheimer
2. Comparar el metiloma en personas nonagenarias con y sin demencia de Alzheimer para identificar regiones diferencialmente metiladas entre los grupos
3. Identificar los genes presentes en las regiones diferencialmente metiladas que podrían estar involucrados en la patología de la enfermedad
4. Determinar por medio de herramientas computacionales la correlación entre sangre y cerebro en el grado de metilación de los genes identificados

**Artículo:****Comparative whole genome DNA methylation profiling in Costa Rican nonagenarians with and without dementia: significant difference between chronological and epigenetic age and further evidence for a role of PM20D1**

*C. Coto-Vilchez<sup>1</sup>, G. Chavarria-Soley<sup>1,2</sup>, D. Valerio<sup>3</sup>, L. Mora-Villalobos<sup>2</sup>, AD. Genis-Mendoza<sup>4</sup>, JJ. Martínez-Magaña<sup>4</sup>, JM. Silverman<sup>5</sup>, H. Nicolini<sup>4</sup>, H. Raventós<sup>1,2</sup>.*

1) Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica; 2) Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica; 3) e Hospital Nacional de Geriátría y Gerontología de Costa Rica, San José, Costa Rica; 4) Instituto Nacional de Medicina Genómica, México; 5) Department of Psychiatry, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

**ABSTRACT:** Alzheimer's disease (AD) is a complex disorder that results from a combination of genetic and non-genetic risk factors. There are genetic variants that may be protective against the development of dementia at advanced ages. Most epigenetic and non-epigenetics studies of successful cognitive aging have focused on individuals with and without dementia in the age range 65-85, but there is less information on epigenetic markers of normal cognitive aging. In this study, we compared whole blood DNA methylation profiles of Costa Rican nonagenarians, 21 cognitively healthy (mean age 93, SD=2.8) and 11 with AD (mean age 95, SD=3.4), using the Infinium MethylationEPIC BeadChip. First, we calculated the epigenetic age of the participants based on Horvath's epigenetic clock. On average, the epigenetic age was 73 years in both groups, which represents a difference of 23 years between the epigenetic age and the chronological age in the case of cognitively healthy people and of 22 years in the case of people with dementia. We also used two different approaches; DMRcate and Bumphunter, to identify differentially methylated regions (DMRs). The analysis revealed 11 DMRs between groups, which contain five genes and two pseudogenes. These genes are involved in cell cycle regulation, embryogenesis, synthesis of ceramides, and migration of interneurons to the cerebral cortex. One of the five differentially methylated genes is *PM20D1*. In accordance with other studies, we found that the gene is hypermethylated in AD. Previous

studies have found that this gene is associated with AD, and it is a QTL for both expression and methylation.

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly. It is a complex disorder that results from a combination of genetic and non-genetic risk factors, in which the environment plays an important role in its development. Age is the main risk factor for developing AD: the disease is present in 1–3% of those between ages 60 and 70, 3–12% of those between ages 70 and 80, and 25–35% of those older than age 85 (Farrer et al., 1997; Hudspeth et al., 2013; Mayeux & Stern, 2012). Some risk factors for AD are modifiable, that is, they are relevant for prevention. Factors such as smoking, years of education, cognitive stimulation, exercise, and diet have been found to play a role in the disease (Norton et al., 2014; Scarmeas et al., 2009; Chodosh et al., 2002).

Multiple genes have been identified with variants that increase the risk for late onset AD (Cuyvers & Sleegers, 2016). Furthermore, there are also genetic variants that may be protective against the development of dementia at advanced ages (Suri, Heise, Trachtenberg & Mackay, 2013). The level of protection in each individual depends on the effect of multiple factors such as aging, genetics (protective and risk variants), lifestyle, cardiovascular health, and others. It has been proposed that individuals with a positive balance of protective factors can reach advanced ages without developing dementia (Vemuri et al., 2017).

Genes with variants that protect against late life dementia may overlap with genes with variants that increase the risk. That is the case of apolipoprotein E (*APOE*) gene, which is a risk factor for dementia and cardiovascular disease (Myers & Nemeroff, 2012). The *APOE-ε4* allele increases risk of dementia, and the *APOE-ε2* allele protects against it (Corder et al., 1993; Corder et al., 1994). Protective genetic variants may explain cases of high levels of AD neuropathology found in brains of very long-lived cognitively intact individuals (Berlau, Corrada, Head & Kawas 2009). However, some studies have found that the association between *APOE-ε4* allele and dementia declines with age in individuals older than 80 years old, suggesting a survivor effect model for successful cognitive aging

(SCA) in old age (Scacchi et al., 1995; Valerio et al., 2014). Therefore, the study of SCA should focus on the identification of protective factors in genetic studies, but this is more difficult than identifying risk factors for dementia (Silverman & Schmeidler, 2018).

In the last years, epigenetic modifications of the genome have gained attention in complex diseases such as AD, and the identification of epigenetically dysregulated genes has been increasing (Sanchez-Mut & Gräff, 2015). For example, important genes in the context of AD physiopathology, such as amyloid precursor protein (APP), have been found to be differentially methylated between individuals with and without dementia. However, only the ankyrin 1 (*ANK1*), sorbin and SH3-domain-containing 3 (*SORBS3*), and histone deacetylase 2 (*HDAC2*) genes have been reported as dysregulated by independent studies in humans (Sanchez-Mut & Gräff, 2015).

There is abundant evidence of alterations in methylation patterns in individuals with dementia compared with non-affected ones, but information about epigenetic markers of normal cognitive aging is lacking (Mastroeni et al., 2011; Spiegel, Sewal & Rapp 2014). Moreover, most epigenetic and non-epigenetics studies of SCA have focused on individuals between 65 and 85 years old, and representation of nonagenarians or centenarians has been scarce (Depp & Jeste, 2006).

Nondemented individuals aged 90 years and above are an interesting population to study protective factors for dementia. Their first-degree relatives have been observed to maintain intact cognitive function in comparison to relatives of younger, nondemented elderly. Also, high heritability of cognitive functions such as memory has been identified in this population (Silverman et al., 2008; Greenwood et al., 2011).

The aim of this study is to identify differentially methylated regions (DMRs) in the genomes of a sample of cognitively healthy individuals and a sample of individuals with AD, all of them over 90 years of age, from the Central Valley of Costa Rica (CVCR).



## **METHODS**

### Sample selection:

The subjects were recruited in the studies “Successful Cognitive Aging and Cardiovascular Risk Factors in the Central Valley of Costa Rica”, funded by a NIH Fogarty International Center & National Institute on Aging grant (R21TW009258), and P01-AG02219 grant funded by the Alzheimer’s Association. Both projects were reviewed and approved by the Institutional Review Board of the University of Costa Rica and the Mount Sinai Medical School. The study was explained to each subject and written informed consent was obtained. If the subject was unable to give consent because of cognitive impairment, consent was obtained from the spouse or the primary relative caretaker.

All subjects were clinically assessed by a medical geriatrician and a psychologist with a general medical examination, the Clinical Dementia Rating scale (CDR) and the Mini-Mental State Examination (MMSE) (Hughes et al., 1982; Folstein, Folstein & McHugh, 1975). In the CDR, clinical information is collected from both an informant and the subject. A CDR score of zero indicates no dementia or a recent decline in cognition or functioning, and a score of 3 indicates dementia. In the MMSE, a score between 27 and 30 indicates absence of cognitive impairment, and values below 6 indicate severe dementia. Diagnosis of AD was defined by the geriatrician based on the clinical history and the CDR and MMSE scores. Patients with a history of stroke or the presence of a disorder other than AD that potentially causes dementia were excluded.

For this study, we only included female probands over 90 years old, with between 0 and 9 years of schooling, at least one pregnancy, married or widowed, menopause between 50 and 55 years of age, and without hormone replacement therapy with estrogen. These criteria were used to make the sample as homogeneous as possible.

### Sample preparation and data collection:

Whole blood was collected by peripheral venipuncture from participants and DNA was extracted using the sucrose method (Cheung et al., 1993). DNA was bisulfite converted with the Zymo Research EZ DNA Methylation™ Kit (Irvine, CA, USA). We obtained genome-wide methylation profiles using the Infinium HumanMethylationEPIC BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA).

Data processing was made with minfi R package (Aryee et al., 2014). Quality control was first performed to detect samples that fail to adequately detect DNAm (in our case, all samples passed quality control). Then, we removed probes that could cross-hybridize or overlap with SNPs, which could confound results. Probes with a detection  $p > 0.05$ , and probes that failed in more than 50% of the samples were removed. The total number of probes post-filtering was 794,770. We used FunNorm normalization to remove unwanted variation by regressing out variability explained by the control probes present on the array (Fortin et al., 2014). To estimate cell-type proportions including CD8+ T lymphocytes, CD4+ T lymphocytes, natural killer cells, B cells, monocytes, and granulocytes, we applied Houseman's algorithm using the minfi R package (Houseman et al., 2012).

The proportion of DNAm at a particular CpG site ( $\beta$  values) was ascertained by taking the ratio of the methylated (C) to unmethylated (T) signal, using the formula:  $\beta = \text{intensity of the methylated signal} / (\text{intensity of the unmethylated signal} + \text{intensity of the methylated signal} + 100)$ .  $\beta$  values range from 0 (completely unmethylated) to 1 (completely methylated) (Bibikova et al., 2011).

#### Prediction of epigenetic age

The Horvath method in R was used to determine DNAm-based age prediction. This method uses a weighted average of DNA methylation at 353 clock CpG sites, which is then transformed to DNAm age using a calibration function (Horvath, 2013). Mean differences between cohorts were assessed using the Kruskal–Wallis test.

#### Identification of differentially methylated regions

We applied two different methods to identify DMRs between nonagenarians with and without dementia: DMRcate and ChAMP-Bumphunter (Peters et al., 2016; Morris et al., 2013). We assigned a p-value cutoff of 0.05 to determine DMRs in both DMRcate and Bumphunter. This was the significance threshold for including DMRs in the final DMR list. We used the FDR method to adjust for multiple tests.

Once the DMRs were identified, we used the web application BECon to verify the correlation between the methylation in blood and the methylation in brain for each one of the CpG sites of the DMRs (Edgar, Jones, Meaney, Turecki & Kobor, 2017). This tool uses

a DNAm database from paired samples of blood and three postmortem brain regions from individuals to show how informative DNAm from the blood is for brain DNAm.

## RESULTS

### Epigenetic age

The average epigenetic age of the AD group was 73 (SD=5.99), and the average chronological age was 95 (SD=3.36). In the SCA group, the average epigenetic age of the AD group was 73 (SD=5.85), and the average chronological age was 93 (SD=2.77). Neither the epigenetic age nor the difference between epigenetic age ( $p=0.42$ ) and biological age ( $p=0.53$ ) differ between groups ( $p=0.42$ ). Nevertheless, when analyzing the sample as a whole, a significant difference was obtained between chronological and epigenetic age ( $p=0.0487$ ).

### Differentially methylated regions

We assayed DNAm profiles of 32 females, of which 21 were cognitively healthy (mean age 93, SD=2.8) and 11 had AD (mean age 95, SD=3.4). The age range is between 90 and 103 years old. No statistically significant differences were found in the cellular composition between the dementia and the SCA group, in any of the cell types, so this variable was not included in the analysis. After detection of DMRs with the DMRcate and Bumphunter methods, we chose the 11 DMRs that both methods found in common for further analysis (Table 1). Four of the 11 DMRs are hypomethylated in SCA group compared with the dementia group, while seven of them are hypermethylated. The mean length of the DMRs was 603 bp, with 197 bp in the shortest region and of 1736 bp in the longest. On average, in the 11 DMRs observed, there were 11 CpG sites per region, with a range of 6 to 18 CpG sites. Five out of the 11 DMRs include known genes, and two include pseudogenes. The results of the correlation in blood and brain methylation for each of the regions are shown in Table 1.

## DISCUSSION

DNA methylation levels have been proposed as biomarkers of aging, since chronological age correlates with DNA methylation in most human tissues and cell types (Horvath, 2013; Horvath & Raj, 2018). In addition, this measure has predictive value for all-cause mortality and, estimated from blood extracted DNA, correlates with measures of cognitive and physical fitness in 70 year-olds (Marioni et al., 2015a; Marioni et al., 2015b). Although we found a 20-year difference between chronological and epigenetic age in all our samples, no difference was observed between the SCA and AD groups using Horvath's DNAm age predictors. This is in contrast with the results in brain tissue of Levine et al. (2015), who found that postmortem DNAm age in dorsolateral prefrontal cortex was associated with neuropathological variables and pre-mortem measures of cognitive decline among individuals with AD.

Nevertheless, our results are very interesting in the context of long-lived individuals studies. Costa Rica is the second country in America with the greatest longevity after Canada (Rosero-Bixby & Dow, 2009). At the age of 90, Costa Rican nonagenarians have a life expectancy of 4.4 years, which is half a year more than any other country of the world (Rosero-Bixby, 2008). As in other studies, epigenetic age was lower than chronological age; however, we found this difference to be greater. McEwen et al. (2017) studied DNA methylation in a sample from Nicoya, a Costa Rican high longevity region. No difference was found in epigenetic age between Nicoyans and a sample of people of other regions of Costa Rica. However, they reported a difference of -6.9 years between epigenetic age and chronological age when analyzing the whole sample and -12.7 years in centenarians. These results are consistent with the report of an epigenetically younger age in Hispanic populations (Horvath et al., 2016).

Similar results have also been found in other populations, nonagenarians from Sydney, Australia showed a difference of -9.56 years between epigenetic and chronological age (Armstrong et al., 2017). Furthermore, centenarians from an Italian cohort were 8.6 years younger than their chronological age, while their offspring have a lower epigenetic age than age-matched controls (Horvath et al., 2015). More research is required to understand the reasons for these differences.

The differentially methylated regions between SCA and AD found in this study are also interesting. Some of them have been reported to be associated to AD or related to pathways associated with AD. The gene known as peptidase M20-domain-containing protein 1 (*PM20D1*) was found to be hypomethylated in the SCA sample. This gene has been associated with AD, and additional evidence shows that it is both a methylation and an expression QTL (Heyn et al., 2013; GTEx Consortium, 2015; Sánchez-Mut et al., 2018). Recent evidence indicates that *PM20D1* expression might provide a potential cellular defense mechanism against AD (Sánchez-Mut et al., 2018). *In vitro* assays showed an increased *PM20D1* expression in neuroblastoma cells treated with reactive oxygen species (ROS) and amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ), emulating an AD model. On the other hand, an analysis of brain tissue in a mouse model of AD, which develops AD-related pathologies with age, such as amyloid plaques, astrogliosis and learning deficits, showed increased *PM20D1* expression in the frontal cortex at symptomatic stages of the disease in comparison with presymptomatic stages and controls. In addition, manipulation of *PM20D1* levels showed that overexpression of *PM20D1* reduced cell death and decreased A $\beta$  levels in *in vivo* and *in vitro* assays.

Sánchez-Mut et al. (2018) found a significant enrichment of *PM20D1* repression in AD, by analyzing DNA methylation and RNA expression. The repression occurs by a CCCTC-binding-factor-mediated chromatin loop that depends on an AD-associated haplotype. Genetic analysis of human brain cortex samples showed an allele-dependent correlation between the haplotype of two mQTL associated SNPs, rs708727 and rs960603, and *PM20D1* promoter methylation. *PM20D1* expression was increased in non-risk haplotype carriers with AD compared to non-risk haplotype carriers without AD. Also, as in most cases, *PM20D1* expression was inversely correlated with the methylation of its promoter (Sánchez-Mut et al., 2018).

Interestingly, *PM20D1* has been associated with obesity and diabetes, which are risk factors for AD (Long et al., 2016; Larrick, Larrick & Mendelsohn, 2016; Profenno, Porsteinsson & Faraone, 2010). *PM20D1* lies within the Parkinson disease 16 (susceptibility) locus on chromosome 1, which has previously been associated with Parkinson's disease (Simon-Sanchez et al., 2009). In addition, *PM20D1* has been reported to be differentially methylated in individuals with obesity and in multiple sclerosis patients

(Feinberg et al., 2010; Maltby et al., 2017).

The gene *LHX6* encodes a member of a protein family that contains the LIM domain, a unique cysteine-rich zinc-binding domain. The protein is a transcription factor involved in embryogenesis and in the expression of a subset of genes involved in interneuron migration and development (Lavdas, Grigoriou, Pachnis & Parnavelas, 1999; Zhang et al., 2013). The gene is highly expressed in neural crest derived mesenchyme cells (Grigoriou, Tucker, Sharpe & Pachnis, 1998). In our sample this region was found to be hypermethylated.

Another one of the differentially methylated genes, *CERS3* is a member of the ceramide synthase family of genes, this region was found to be hypermethylated in our sample. This type of enzymes regulates sphingolipid synthesis by catalyzing the formation of ceramides from sphingoid base and acyl-coA substrates. Several lines of evidence suggest that there is a causal link between ceramide or sphingolipids levels and neurodegenerative diseases such as AD (Ben-David & Futerman, 2010). However, *CERS3* is the only one out of the six-ceramide synthases that is not expressed in brain tissue (Becker, Wang-Eckhardt, Yaghootfam, Gieselmann & Eckhardt, 2008). Its expression has been reported especially in testis and skin (Riebeling, Allegood, Wang, Merrill & Futerman, 2003; Mizutani, Kihara & Igarashi, 2005). In addition, the gene is associated with ichthyosis (Radner et al., 2013).

The gene *vtRNA2-1*, also known as *nc886*, encodes a non-coding RNA that represses PKR, a double-stranded RNA dependent kinase, involved in tumor-suppression (Jeon et al., 2012; Jeon, Johnson & Lee, 2012). This gene is often hypermethylated and repressed in cancers (Fort et al., 2018; Lee et al., 2014, Lee et al., 2014). Romanelli et al. (2014) showed that *vtRNA2-1* region is variably maternally imprinted, namely, it has allele-specific methylation and shows variable levels of methylation levels among tissues. In our sample this region was found to be hypermethylated.

The Protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 2 Pseudogene, *PPP1R2P1*, is a pseudogene, in our sample the gene was hypomethylated. Evidence shows that *PPP1R2P1* is expressed, but its function remains unknown (Korrodi-Gregório et al., 2013).

The last gene, *PRSS22*, encodes a member of the trypsin family of serine proteases. The enzyme is expressed in the airway epithelial cells in a developmentally regulated manner (Wong et al., 2001). We found this gene hypomethylated in our sample. *DOC2GP* is expressed mainly in heart, spleen and thyroid, while *C17orf98* only in testis (Fagerberg et al. 2014).

Regarding the correlation between blood and brain methylation, it was very variable among the DMRs. The lowest correlation was of -0.004, and the highest was 0.701. Three out of the five DMRs that contain genes present a correlation above 0.55. The DMR with the highest correlation contains neither a gene nor a pseudogene. A limitation in the determination of the correlations was that the BECon tool does not have information for all the CpG sites of our DMRs, so the average correlation between blood and brain was calculated excluding some sites from the DMR regions.

In conclusion, our work adds evidence to suggest that long-lived individuals have a lower epigenetic age than their chronological age. This work also supports the possible role of *PM20D1* in protection against AD, by showing the differential methylation in blood in a longer-lived population. Finally, we found other differentially methylated regions with genes involved in cell cycle regulation, embryogenesis, synthesis of ceramides, and migration of interneurons to the cerebral cortex, that might have a role in AD and SCA, which merit further studies.

## REFERENCES

- Armstrong, N. J., Mather, K. A., Thalamuthu, A., Wright, M. J., Trollor, J. N., Ames, D., ... & Kwok, J. B. (2017). Aging, exceptional longevity and comparisons of the Hannum and Horvath epigenetic clocks. *Epigenomics*, 9(5), 689-700.
- Aryee, M. J., Jaffe, A. E., Corrada-Bravo, H., Ladd-Acosta, C., Feinberg, A. P., Hansen, K. D., & Irizarry, R. A. (2014). Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*, 30(10), 1363-1369.

- Becker, I., Wang-Eckhardt, L., Yaghootfam, A., Gieselmann, V., & Eckhardt, M. (2008). Differential expression of (dihydro) ceramide synthases in mouse brain: oligodendrocyte-specific expression of CerS2/Lass2. *Histochemistry and cell biology*, 129(2), 233-241.
- Ben-David, O., & Futerman, A. H. (2010). The role of the ceramide acyl chain length in neurodegeneration: involvement of ceramide synthases. *Neuromolecular medicine*, 12(4), 341-350.
- Berlau, D. J., Corrada, M. M., Head, E., & Kawas, C. H. (2009). APOE ε2 is associated with intact cognition but increased Alzheimer pathology in the oldest old. *Neurology*, 72(9), 829-834.
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., ... & Fan, J. B. (2011). High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98(4), 288-295.
- Cheung, W. Y., Hubert, N., & Landry, B. S. (1993). A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. *Genome Research*, 3(1), 69-70.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Risch, N. J., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., ... & Small, G. W. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature genetics*, 7(2), 180.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G., ... & Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123), 921-923.
- Cuyvers, E., & Sleegers, K. (2016). Genetic variations underlying Alzheimer's disease: evidence from genome-wide association studies and beyond. *The Lancet Neurology*, 15(8), 857-868.



- Depp, C. A., & Jeste, D. V. (2006). Definitions and predictors of successful aging: a comprehensive review of larger quantitative studies. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, *14*(1), 6-20.
- Edgar, R. D., Jones, M. J., Meaney, M. J., Turecki, G., & Kobor, M. S. (2017). BECon: a tool for interpreting DNA methylation findings from blood in the context of brain. *Translational psychiatry*, *7*(8), e1187.
- Fagerberg, L., Hallström, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., ... & Asplund, A. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(2), 397-406.
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., ... & Van Duijn, C. M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Jama*, *278*(16), 1349-1356.
- Feinberg, A. P., Irizarry, R. A., Fradin, D., Aryee, M. J., Murakami, P., Aspelund, T., ... & Fallin, M. D. (2010). Personalized epigenomic signatures that are stable over time and covary with body mass index. *Science translational medicine*, *2*(49), 49ra67-49ra67.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*, *12*(3), 189-198.
- Fort, R. S., Mathó, C., Geraldo, M. V., Ottati, M. C., Yamashita, A. S., Saito, K. C., ... & Garat, B. (2018). Nc886 is epigenetically repressed in prostate cancer and acts as a tumor suppressor through the inhibition of cell growth. *BMC cancer*, *18*(1), 127.
- Fortin, J. P., Labbe, A., Lemire, M., Zanke, B. W., Hudson, T. J., Fertig, E. J., ... & Hansen, K. D. (2014). Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome biology*, *15*(11), 503.

- Greenwood, T. A., Beerli, M. S., Schmeidler, J., Valerio, D., Raventós, H., Mora-Villalobos, L., ... & Sano, M. (2011). Heritability of cognitive functions in families of successful cognitive aging probands from the Central Valley of Costa Rica. *Journal of Alzheimer's Disease*, 27(4), 897-907.
- Grigoriou, M., Tucker, A. S., Sharpe, P. T., & Pachnis, V. (1998). Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development*, 125(11), 2063-2074.
- GTEx Consortium. (2015). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science*, 348(6235), 648-660.
- Heyn, H., Moran, S., Hernando-Herraez, I., Sayols, S., Gomez, A., Sandoval, J., ... & Esteller, M. (2013). DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome research*, 23(9), 1363-1372.
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology*, 14(10), 3156.
- Horvath, S., & Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Reviews Genetics*, 19(6), 371.
- Horvath, S., Gurven, M., Levine, M. E., Trumble, B. C., Kaplan, H., Allayee, H., ... & Jamieson, B. D. (2016). An epigenetic clock analysis of race/ethnicity, sex, and coronary heart disease. *Genome biology*, 17(1), 171.
- Horvath, S., Pirazzini, C., Bacalini, M. G., Gentilini, D., Di Blasio, A. M., Delledonne, M., ... & De Rango, F. (2015). Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging (Albany NY)*, 7(12), 1159.
- Houseman, E. A., Accomando, W. P., Koestler, D. C., Christensen, B. C., Marsit, C. J., Nelson, H. H., ... & Kelsey, K. T. (2012). DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC bioinformatics*, 13(1), 86.
- Hudspeth, A. J., Jessell, T. M., Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Siegelbaum, S. A. (Eds.). (2013). *Principles of neural science*.

- Hughes, C. P., Berg, L., Danziger, W., Coben, L. A., & Martin, R. L. (1982). A new clinical scale for the staging of dementia. *The British journal of psychiatry*, 140(6), 566-572.
- Jeon, S. H., Lee, K., Lee, K. S., Kunkeaw, N., Johnson, B. H., Holthausen, L. M. F., ... & Lee, Y. S. (2012). Characterization of the direct physical interaction of nc886, a cellular non-coding RNA, and PKR. *FEBS letters*, 586(19), 3477-3484.
- Jeon, S., Johnson, B., & Lee, Y. (2012). A tumor surveillance model: a non-coding RNA senses neoplastic cells and its protein partner signals cell death. *International journal of molecular sciences*, 13(10), 13134-13139.
- Korrodi-Gregório, L., Abrantes, J., Muller, T., Melo-Ferreira, J., Marcus, K., e Silva, O. A. D. C., ... & Esteves, P. J. (2013). Not so pseudo: the evolutionary history of protein phosphatase 1 regulatory subunit 2 and related pseudogenes. *BMC evolutionary biology*, 13(1), 242.
- Kunkeaw, N., Jeon, S. H., Lee, K., Johnson, B. H., Tanasanvimon, S., Javle, M., ... & Leelayuwat, C. (2013). Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma. *Oncogene*, 32(32), 3722.
- Larrick, J. W., Larrick, J. W., & Mendelsohn, A. R. (2016). Uncoupling mitochondrial respiration for diabetes. *Rejuvenation research*, 19(4), 337-340.
- Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V., & Parnavelas, J. G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 19(18), 7881-7888.
- Lee, H. S., Lee, K., Jang, H. J., Lee, G. K., Park, J. L., Kim, S. Y., ... & Lee, Y. S. (2014). Epigenetic silencing of the non-coding RNA nc886 provokes oncogenes during human esophageal tumorigenesis. *Oncotarget*, 5(11), 3472.
- Lee, K. S., Park, J. L., Lee, K., Richardson, L. E., Johnson, B. H., Lee, H. S., ... & Kim, Y. S. (2014). nc886, a non-coding RNA of anti-proliferative role, is suppressed by CpG DNA methylation in human gastric cancer. *Oncotarget*, 5(11), 3944.

- Long, J. Z., Svensson, K. J., Bateman, L. A., Lin, H., Kamenecka, T., Lokurkar, I. A., ... & Paulo, J. A. (2016). The secreted enzyme PM20D1 regulates lipidated amino acid uncouplers of mitochondria. *Cell*, *166*(2), 424-435.
- Maltby, V. E., Lea, R. A., Sanders, K. A., White, N., Benton, M. C., Scott, R. J., & Lechner-Scott, J. (2017). Differential methylation at MHC in CD4+ T cells is associated with multiple sclerosis independently of HLA-DRB1. *Clinical epigenetics*, *9*(1), 71.
- Marioni, R. E., Shah, S., McRae, A. F., Chen, B. H., Colicino, E., Harris, S. E., ... & Pattie, A. (2015a). DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome biology*, *16*(1), 25.
- Marioni, R. E., Shah, S., McRae, A. F., Ritchie, S. J., Muniz-Terrera, G., Harris, S. E., ... & Corley, J. (2015b). The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *International journal of epidemiology*, *44*(4), 1388-1396.
- Mastroeni, D., Grover, A., Delvaux, E., Whiteside, C., Coleman, P. D., & Rogers, J. (2011). Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, *32*(7), 1161-1180.
- Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *2*(8), a006239.
- McEwen, L. M., Morin, A. M., Edgar, R. D., MacIsaac, J. L., Jones, M. J., Dow, W. H., ... & Rehkopf, D. H. (2017). Differential DNA methylation and lymphocyte proportions in a Costa Rican high longevity region. *Epigenetics & chromatin*, *10*(1), 21.
- Mizutani, Y., Kihara, A., & Igarashi, Y. (2005). Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *Biochemical Journal*, *390*(1), 263-271.

- Morris, T. J., Butcher, L. M., Feber, A., Teschendorff, A. E., Chakravarthy, A. R., Wojdacz, T. K., & Beck, S. (2013). ChAMP: 450k chip analysis methylation pipeline. *Bioinformatics*, 30(3), 428-430.
- Myers, A. J., & Nemeroff, C. B. (2012). APOE: a risk factor for multiple disorders. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 20(7), 545-548.
- Peters, T., Peters, M. T., biocViews DifferentialMethylation, G., GenomeAnnotation, D., OneChannel, T., & MultipleComparison, Q. (2016). Package 'DMRcate'.
- Profenno, L. A., Porsteinsson, A. P., & Faraone, S. V. (2010). Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biological psychiatry*, 67(6), 505-512.
- Radner, F. P., Marrakchi, S., Kirchmeier, P., Kim, G. J., Ribierre, F., Kamoun, B., ... & Heilig, R. (2013). Mutations in CERS3 cause autosomal recessive congenital ichthyosis in humans. *PLoS genetics*, 9(6), e1003536.
- Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 7(3), 137.
- Rosero-Bixby, L. (2008). The exceptionally high life expectancy of Costa Rican nonagenarians. *Demography*, 45(3), 673-691.
- Rosero-Bixby, L., & Dow, W. H. (2009). Surprising SES gradients in mortality, health, and biomarkers in a Latin American population of adults. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences*, 64(1), 105-117.
- Riebeling, C., Allegood, J. C., Wang, E., Merrill, A. H., & Futerman, A. H. (2003). Two mammalian longevity assurance gene (LAG1) family members, trh1 and trh4, regulate dihydroceramide synthesis using different fatty acyl-CoA donors. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43452-43459.
- Sanchez-Mut, J. V., & Gräff, J. (2015). Epigenetic alterations in Alzheimer's disease. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9, 347.

- Sanchez-Mut, J. V., Heyn, H., Silva, B. A., Dixsaut, L., Garcia-Esparcia, P., Vidal, E., ... & Ferrer, I. (2018). PM20D1 is a quantitative trait locus associated with Alzheimer's disease. *Nature medicine*, *24*(5), 598.
- Scacchi, R., De Bernardini, L., Mantuano, E., Donini, L. M., Vilardo, T., & Corbo, R. M. (1995). Apolipoprotein E (APOE) allele frequencies in late-onset sporadic Alzheimer's disease (AD), mixed dementia and vascular dementia: lack of association of  $\epsilon 4$  allele with AD in Italian octogenarian patients. *Neuroscience letters*, *201*(3), 231-234.
- Silverman, J. M., & Schmeidler, J. (2018). The protected survivor model: using resistant successful cognitive aging to identify protection in the very old. *Medical hypotheses*, *110*, 9-14.
- Silverman, J. M., Schnaider-Beeri, M., Grossman, H. T., Schmeidler, J., Wang, J. Y., & Lally, R. C. (2008). A phenotype for genetic studies of successful cognitive aging. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, *147*(2), 167-173.
- Simon-Sanchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., ... & Krüger, R. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature genetics*, *41*(12), 1308.
- Spiegel, A. M., Sewal, A. S., & Rapp, P. R. (2014). Epigenetic contributions to cognitive aging: disentangling mindspan and lifespan. *Learning & Memory*, *21*(10), 569-574.
- Suri, S., Heise, V., Trachtenberg, A. J., & Mackay, C. E. (2013). The forgotten APOE allele: a review of the evidence and suggested mechanisms for the protective effect of APOE  $\epsilon 2$ . *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *37*(10), 2878-2886.
- Valerio, D., Raventos, H., Schmeidler, J., Beeri, M. S., Villalobos, L. M., Bolaños-Palmieri, P., ... & Silverman, J. M. (2014). Association of apolipoprotein E-e4 and dementia declines with age. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, *22*(10), 957-960.

- Vemuri, P., Knopman, D. S., Lesnick, T. G., Przybelski, S. A., Mielke, M. M., Graff-Radford, J., ... & Machulda, M. M. (2017). Evaluation of amyloid protective factors and Alzheimer disease neurodegeneration protective factors in elderly individuals. *JAMA neurology*, *74*(6), 718-726.
- Wong, G. W., Yasuda, S., Madhusudhan, M. S., Li, L., Yang, Y., Krilis, S. A., ... & Stevens, R. L. (2001). Human tryptase  $\epsilon$  (PRSS22), a new member of the chromosome 16p13.3 family of human serine proteases expressed in airway epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(52), 49169-49182.
- Zhang, Z., Gutierrez, D., Li, X., Bidlack, F., Cao, H., Wang, J., ... & Amendt, B. A. (2013). The LIM Homeodomain Transcription Factor LHX6 a transcriptional repressor that interacts with pituitary homeobox 2 (PITX2) to regulate odontogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(4), 2485-2500.

Table 1. Differentially methylated genomic regions between non demented and demented.

Genomic coordinates*	DMR length (bp)	# CpGs	Associated gene	Genomic region	Mean $\Delta\beta$	Max $\Delta\beta$	Methylation status SCA vs dementia	p Bumphunter	p DMRCate	Blood-brain correlation
chr1: 205818956 - 205819609	653	12	<i>PM20D1</i>	Promoter	-0,12	-0,19	Hypomethylated	0,0006	$6,6540 \times 10^{-8}$	0,6271
chr9: 124988720 - 124990456	1736	13	<i>LHX6</i>	Intragenic, promoter	0,12	0,18	Hypermethylated	0,0003	$2,5250 \times 10^{-10}$	-0,0044
chr15: 101084980 - 101085177	197	6	<i>CERS3</i>	Promoter	0,10	0,15	Hypermethylated	0,0037	$3,3371 \times 10^{-7}$	0,5683
chr5: 135415693 - 135416029	336	6	<i>vtRNA2-1</i>	Intergenic	0,10	0,16	Hypermethylated	0,0004	0,0072	0,6993
chr16: 2907819 - 2908245	426	8	<i>PRSS22</i>	Intragenic, promoter	0,04	0,06	Hypermethylated	0,0223	$9,3571 \times 10^{-5}$	0,1105
chr6: 32847548 - 32847845	297	13	<i>PPP1R2P1</i>	Intergenic	-0,07	-0,11	Hypomethylated	0,0032	$7,4465 \times 10^{-12}$	0,0541
chr17: 36997420 - 36997740	320	8	<i>C17orf98</i>	Promoter	-0,09	-0,15	Hypomethylated	0,0022	$2,0186 \times 10^{-20}$	0,3842
chr11: 67383377 - 67384040	663	8	<i>DOC2GP</i>	Promoter	0,10	0,14	Hypermethylated	0,0123	$3,3508 \times 10^{-5}$	0,1444
chr6: 29648225 - 29648756	531	18	-	Intergenic	0,10	0,21	Hypermethylated	0,0003	0,0350	0,7011
chr6: 31148332 - 31148748	416	15	-	Intergenic	-0,10	-0,16	Hypomethylated	0,0007	$4,5671 \times 10^{-13}$	0,1893
chr6: 31275148 - 31276212	1064	17	-	Intergenic	0,05	0,13	Hypermethylated	0,0039	0,0020	0,3926

$\Delta\beta$ : (Delta beta; absolute mean or max difference of  $\beta$  values between groups (Cognitive healthy–dementia)

\* Genome coordinates from Human Genome GRCh37/hg19 Assembly



## Conclusiones

La mayoría de estudios tanto epigenéticos como no epigenéticos sobre envejecimiento cognitivo exitoso se realizan en individuos con y sin demencia de Alzheimer en edades entre los 65 y los 85 años. Sin embargo, hace falta información sobre procesos epigenéticos del envejecimiento cognitivo normal a edades más avanzadas. Es por esto que en la presente investigación se analizaron muestras de individuos con edad superior a los 90 años.

Este trabajo presenta evidencia adicional a lo reportado por otros autores con respecto a que individuos longevos poseen una edad epigenética significativamente menor a su edad cronológica. En la muestra total, la diferencia entre ambas edades es de 23 años, la cual es mayor a la reportada en otros estudios

Con respecto a las regiones diferencialmente metiladas entre el grupo con Alzheimer y el grupo cognitivamente sano, por medio de dos diferentes metodologías se encontraron 11 de ellas, dentro de las cuales se encontraron cinco genes y dos pseudogenes. Los genes encontrados participan en regulación del ciclo celular, embriogénesis, síntesis de ceramidas y migración interneuronal a la corteza cerebral, los cuales podrían estar involucrados tanto en Alzheimer como en envejecimiento cognitivo exitoso.

Esta investigación respalda el posible rol protector del gen *PM20D1* en la enfermedad de Alzheimer. Otros estudios han encontrado el gen hipermetilado en tejido cerebral en AD, lo que coincide con el resultado obtenido del patrón de metilación en sangre. Este gen se ha asociado a AD y es un QTL tanto de expresión de metilación.

### Referencias bibliográficas

- Akhtar, M. W., Kim, M. S., Adachi, M., Morris, M. J., Qi, X., Richardson, J. A., ... & Monteggia, L. M. (2012). In vivo analysis of MEF2 transcription factors in synapse regulation and neuronal survival. *PloS one*, 7(4), e34863.
- Allis, C.D., T. Jenuwein, & D. Reinberg (2006). Overview and concepts. In C.D. Allis, T. Jenuwein, & D. Reinberg (Eds.), *Epigenetics* (pp.23-62). New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Alzheimer's Association. (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 12(4), 459-509.
- Arai, H., Lee, V. M. Y., Hill, W. D., Greenberg, B. D., & Trojanowski, J. Q. (1992). Lewy bodies contain beta-amyloid precursor proteins of Alzheimer's disease. *Brain research*, 585(1-2), 386-390.
- Armstrong, N. J., Mather, K. A., Thalamuthu, A., Wright, M. J., Trollor, J. N., Ames, D., ... & Kwok, J. B. (2017). Aging, exceptional longevity and comparisons of the Hannum and Horvath epigenetic clocks. *Epigenomics*, 9(5), 689-700.
- Aryee, M. J., Jaffe, A. E., Corrada-Bravo, H., Ladd-Acosta, C., Feinberg, A. P., Hansen, K. D., & Irizarry, R. A. (2014). Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*, 30(10), 1363-1369.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, G., & Jones, E. (2011) Alzheimer's disease. *Lancet*, 377: 1019–1031.
- Bang, O. Y., Kwak, Y. T., Joo, I. S., & Huh, K. (2003). Important link between dementia subtype and apolipoprotein E: a meta-analysis. *Yonsei medical journal*, 44(3), 401-413.
- Barrachina, M., & Ferrer, I. (2009). DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in postmortem brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 68(8), 880-891.

- Becker, I., Wang-Eckhardt, L., Yaghootfam, A., Gieselmann, V., & Eckhardt, M. (2008). Differential expression of (dihydro) ceramide synthases in mouse brain: oligodendrocyte-specific expression of CerS2/Lass2. *Histochemistry and cell biology*, 129(2), 233-241.
- Ben-David, O., & Futerman, A. H. (2010). The role of the ceramide acyl chain length in neurodegeneration: involvement of ceramide synthases. *Neuromolecular medicine*, 12(4), 341-350.
- Berlau, D. J., Corrada, M. M., Head, E., & Kawas, C. H. (2009). APOE  $\epsilon$ 2 is associated with intact cognition but increased Alzheimer pathology in the oldest old. *Neurology*, 72(9), 829-834.
- Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics*, 9(16), 2395-2402.
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., ... & Fan, J. B. (2011). High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98(4), 288-295.
- Bird, A. P. (1985). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321(6067), 209-213.
- Blennow, K., Wallin, A., Fredman, P., Karlsson, I., Gottfries, C. G., & Svennerholm, L. (1990). Blood - brain barrier disturbance in patients with Alzheimer's disease is related to vascular factors. *Acta Neurologica Scandinavica*, 81(4), 323-326.
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., & Arrighi, H. M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*, 3(3), 186-191.
- Buettner, D. (2012). *The Blue Zones: 9 lessons for living longer from the people who've lived the longest*. National Geographic Books.
- Chatterjee, R., & Vinson, C. (2012). CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(7), 763-770.

- Cheung, W. Y., Hubert, N., & Landry, B. S. (1993). A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. *Genome Research*, 3(1), 69-70.
- Chodosh, J., Reuben, D. B., Albert, M. S., & Seeman, T. E. (2002). Predicting cognitive impairment in high - functioning community - dwelling older persons: MacArthur Studies of Successful Aging. *Journal of the American Geriatrics Society*, 50(6), 1051-1060.
- Chouliaras, L., Rutten, B. P., Kenis, G., Peerbooms, O., Visser, P. J., Verhey, F., ... & van den Hove, D. L. (2010). Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*, 90(4), 498-510.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Risch, N. J., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., ... & Small, G. W. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature genetics*, 7(2), 180.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. A., ... & Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123), 921-923.
- Cotman, C. W., & Berchtold, N. C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in neurosciences*, 25(6), 295-301.
- Cuyvers, E., & Sleegers, K. (2016). Genetic variations underlying Alzheimer's disease: evidence from genome-wide association studies and beyond. *The Lancet Neurology*, 15(8), 857-868.
- Dao, A. T., Zagaar, M. A., Levine, A. T., & Alkadhi, K. A. (2016). Comparison of the effect of exercise on late-phase LTP of the dentate gyrus and CA1 of Alzheimer's disease model. *Molecular neurobiology*, 53(10), 6859-6868.
- De Jager, P. L., Srivastava, G., Lunnon, K., Burgess, J., Schalkwyk, L. C., Yu, L., ... & Tang, A. (2014). Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nature neuroscience*, 17(9), 1156-1163.

- Depp, C. A., & Jeste, D. V. (2006). Definitions and predictors of successful aging: a comprehensive review of larger quantitative studies. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 14(1), 6-20.
- Du, P., Zhang, X., Huang, C. C., Jafari, N., Kibbe, W. A., Hou, L., & Lin, S. M. (2010). Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC bioinformatics*, 11(1), 587.
- Edgar, R. D., Jones, M. J., Meaney, M. J., Turecki, G., & Kobor, M. S. (2017). BECon: a tool for interpreting DNA methylation findings from blood in the context of brain. *Translational psychiatry*, 7(8), e1187.
- Esiri, M. M., Nagy, Z., Smith, M. Z., Barnetson, L., & Smith, A. D. (1999). Cerebrovascular disease and threshold for dementia in the early stages of Alzheimer's disease. *The Lancet*, 354(9182), 919-920.
- Fagerberg, L., Hallström, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., ... & Asplund, A. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(2), 397-406.
- Farrall, A. J., & Wardlaw, J. M. (2009). Blood–brain barrier: ageing and microvascular disease—systematic review and meta-analysis. *Neurobiology of aging*, 30(3), 337-352.
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., ... & Van Duijn, C. M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Jama*, 278(16), 1349-1356.
- Feinberg, A. P., Irizarry, R. A., Fradin, D., Aryee, M. J., Murakami, P., Aspelund, T., ... & Fallin, M. D. (2010). Personalized epigenomic signatures that are stable over time and covary with body mass index. *Science translational medicine*, 2(49), 49ra67-49ra67.

- Folstein, M. F., Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*, 12(3), 189-198.
- Fort, R. S., Mathó, C., Geraldo, M. V., Ottati, M. C., Yamashita, A. S., Saito, K. C., ... & Garat, B. (2018). Nc886 is epigenetically repressed in prostate cancer and acts as a tumor suppressor through the inhibition of cell growth. *BMC cancer*, 18(1), 127.
- Fortin, J. P., Labbe, A., Lemire, M., Zanke, B. W., Hudson, T. J., Fertig, E. J., ... & Hansen, K. D. (2014). Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome biology*, 15(11), 503.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., ... & Boix-Chornet, M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10604-10609.
- Fratiglioni, L., Paillard-Borg, S., & Winblad, B. (2004). An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *The Lancet Neurology*, 3(6), 343-353.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., ... & Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1827-1831.
- Furuya, T. K., da Silva, P. N. O., Payão, S. L. M., Rasmussen, L. T., de Labio, R. W., Bertolucci, P. H. F., ... & Mill, J. (2012). SORL1 and SIRT1 mRNA expression and promoter methylation levels in aging and Alzheimer's Disease. *Neurochemistry international*, 61(7), 973-975.
- Fuso, A., Nicolia, V., Cavallaro, R. A., Ricceri, L., D'anselmi, F., Coluccia, P., ... & Scarpa, S. (2008). B-vitamin deprivation induces hyperhomocysteinemia and brain S-adenosylhomocysteine, depletes brain S-adenosylmethionine, and enhances PS1 and BACE expression and amyloid- $\beta$  deposition in mice. *Molecular and cellular neuroscience*, 37(4), 731-746.

- Gatz, M., Reynolds, C. A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. A., Berg, S., ... & Pedersen, N. L. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of general psychiatry*, *63*(2), 168-174.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., ... & Mant, R. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, *349*(6311), 704.
- Greenwood, T. A., Beeri, M. S., Schmeidler, J., Valerio, D., Raventós, H., Mora-Villalobos, L., ... & Sano, M. (2011). Heritability of cognitive functions in families of successful cognitive aging probands from the Central Valley of Costa Rica. *Journal of Alzheimer's Disease*, *27*(4), 897-907.
- Grigoriou, M., Tucker, A. S., Sharpe, P. T., & Pachnis, V. (1998). Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development*, *125*(11), 2063-2074.
- GTEx Consortium. (2015). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science*, *348*(6235), 648-660.
- Heyn, H., Moran, S., Hernando-Herraez, I., Sayols, S., Gomez, A., Sandoval, J., ... & Esteller, M. (2013). DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome research*, *23*(9), 1363-1372.
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J. C., Carrasquillo, M. M., ... & Dowzell, K. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, *43*(5), 429.
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology*, *14*(10), 3156.
- Horvath, S., & Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Reviews Genetics*, *19*(6), 371.

- Horvath, S., Gurven, M., Levine, M. E., Trumble, B. C., Kaplan, H., Allayee, H., ... & Jamieson, B. D. (2016). An epigenetic clock analysis of race/ethnicity, sex, and coronary heart disease. *Genome biology*, *17*(1), 171.
- Horvath, S., Pirazzini, C., Bacalini, M. G., Gentilini, D., Di Blasio, A. M., Delledonne, M., ... & De Rango, F. (2015). Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging (Albany NY)*, *7*(12), 1159.
- Horvath, S., Zhang, Y., Langfelder, P., Kahn, R. S., Boks, M. P., van Eijk, K., ... & Ophoff, R. A. (2012). Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. *Genome biology*, *13*(10), 1.
- Hosono, S., Faruqi, A. F., Dean, F. B., Du, Y., Sun, Z., Wu, X., ... & Lasken, R. S. (2003). Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome research*, *13*(5), 954-964.
- Houseman, E. A., Accomando, W. P., Koestler, D. C., Christensen, B. C., Marsit, C. J., Nelson, H. H., ... & Kelsey, K. T. (2012). DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC bioinformatics*, *13*(1), 86.
- Hudspeth, A. J., Jessell, T. M., Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Siegelbaum, S. A. (Eds.). (2013). *Principles of neural science*.
- Hughes, C. P., Berg, L., Danziger, W., Coben, L. A., & Martin, R. L. (1982). A new clinical scale for the staging of dementia. *The British journal of psychiatry*, *140*(6), 566-572.
- Hutnick, L. K., Golshani, P., Namihira, M., Xue, Z., Matynia, A., Yang, X. W., ... & Fan, G. (2009). DNA hypomethylation restricted to the murine forebrain induces cortical degeneration and impairs postnatal neuronal maturation. *Human molecular genetics*, *18*(15), 2875-2888.
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*, *33*, 245.



- Jeon, S. H., Lee, K., Lee, K. S., Kunkeaw, N., Johnson, B. H., Holthauzen, L. M. F., ... & Lee, Y. S. (2012). Characterization of the direct physical interaction of nc886, a cellular non-coding RNA, and PKR. *FEBS letters*, *586*(19), 3477-3484.
- Jeon, S., Johnson, B., & Lee, Y. (2012). A tumor surveillance model: a non-coding RNA senses neoplastic cells and its protein partner signals cell death. *International journal of molecular sciences*, *13*(10), 13134-13139.
- Jiang, Y., Langley, B., Lubin, F. D., Renthal, W., Wood, M. A., Yasui, D. H., ... & Beckel-Mitchener, A. C. (2008). Epigenetics in the nervous system. *The Journal of Neuroscience*, *28*(46), 11753-11759.
- Jung, M., & Pfeifer, G. P. (2015). Aging and DNA methylation. *BMC biology*, *13*(1), 7.
- Jylhävä, J., Pedersen, N. L., & Hägg, S. (2017). Biological age predictors. *EBioMedicine*, *21*, 29-36.
- Kalaria, R. N. (1992). The blood-brain barrier and cerebral microcirculation in Alzheimer disease. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*, *4*(3), 226-260.
- Katzman, R. (2008). The prevalence and malignancy of alzheimer disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, *4*(6), 378-380.
- Kim, J., Kim, J. Y., & Issa, J. P. J. (2009). Aging and DNA methylation. *Current Chemical Biology*, *3*(1), 1-9.
- Korrodi-Gregório, L., Abrantes, J., Muller, T., Melo-Ferreira, J., Marcus, K., e Silva, O. A. D. C., ... & Esteves, P. J. (2013). Not so pseudo: the evolutionary history of protein phosphatase 1 regulatory subunit 2 and related pseudogenes. *BMC evolutionary biology*, *13*(1), 242.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, *128*(4), 693-705.
- Kovalchuk, O. (2008). Epigenetic research sheds new light on the nature of interactions between organisms and their environment. *Environmental and molecular mutagenesis*, *49*(1), 1-3.

- Kunkeaw, N., Jeon, S. H., Lee, K., Johnson, B. H., Tanasanvimon, S., Javle, M., ... & Leelayuwat, C. (2013). Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma. *Oncogene*, *32*(32), 3722.
- Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., ... & Grenier-Boley, B. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature genetics*, *45*(12), 1452.
- Larrick, J. W., Larrick, J. W., & Mendelsohn, A. R. (2016). Uncoupling mitochondrial respiration for diabetes. *Rejuvenation research*, *19*(4), 337-340.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., & Prydz, H. (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*, *13*(4), 1095-1107.
- Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V., & Parnavelas, J. G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, *19*(18), 7881-7888.
- Lee, C. W., Shih, Y. H., & Kuo, Y. M. (2014). Cerebrovascular pathology and amyloid plaque formation in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, *11*(1), 4-10.
- Lee, H. S., Lee, K., Jang, H. J., Lee, G. K., Park, J. L., Kim, S. Y., ... & Lee, Y. S. (2014). Epigenetic silencing of the non-coding RNA nc886 provokes oncogenes during human esophageal tumorigenesis. *Oncotarget*, *5*(11), 3472.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., ... & Wang, K. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, *269*(5226), 973-977.
- Lipsky, R. H., & Marini, A. M. (2007). Brain - derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior - related plasticity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1122*(1), 130-143.
- Long, J. Z., Svensson, K. J., Bateman, L. A., Lin, H., Kamenecka, T., Lokurkar, I. A., ... & Paulo, J. A. (2016). The secreted enzyme PM20D1 regulates lipidated amino acid uncouplers of mitochondria. *Cell*, *166*(2), 424-435.

- Lunnon, K., Smith, R., Hannon, E., De Jager, P. L., Srivastava, G., Volta, M., ... & Condliffe, D. (2014). Methyloomic profiling implicates cortical deregulation of ANK1 in Alzheimer's disease. *Nature neuroscience*, *17*(9), 1164-1170.
- Maltby, V. E., Lea, R. A., Sanders, K. A., White, N., Benton, M. C., Scott, R. J., & Lechner-Scott, J. (2017). Differential methylation at MHC in CD4+ T cells is associated with multiple sclerosis independently of HLA-DRB1. *Clinical epigenetics*, *9*(1), 71.
- Marioni, R. E., Shah, S., McRae, A. F., Chen, B. H., Colicino, E., Harris, S. E., ... & Pattie, A. (2015a). DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome biology*, *16*(1), 25.
- Marioni, R. E., Shah, S., McRae, A. F., Ritchie, S. J., Muniz-Terrera, G., Harris, S. E., ... & Corley, J. (2015b). The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *International journal of epidemiology*, *44*(4), 1388-1396.
- Marques, S. C., Oliveira, C. R., Pereira, C. M., & Outeiro, T. F. (2011). Epigenetics in neurodegeneration: a new layer of complexity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *35*(2), 348-355.
- Mastroeni, D., Grover, A., Delvaux, E., Whiteside, C., Coleman, P. D., & Rogers, J. (2011). Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, *32*(7), 1161-1180.
- Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *2*(8), a006239.
- Mazzio, E. A., & Soliman, K. F. (2012). Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics*, *7*(2), 119-130.
- McEwen, L. M., Morin, A. M., Edgar, R. D., MacIsaac, J. L., Jones, M. J., Dow, W. H., ... & Rehkopf, D. H. (2017). Differential DNA methylation and lymphocyte proportions in a Costa Rican high longevity region. *Epigenetics & chromatin*, *10*(1), 21.

- Mercer, T. R., & Mattick, J. S. (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nature Structural and Molecular Biology*, *20*(3), 300.
- Miech, R. A., Breitner, J. C. S., Zandi, P. P., Khachaturian, A. S., Anthony, J. C., & Mayer, L. (2002). Incidence of AD may decline in the early 90s for men, later for women The Cache County study. *Neurology*, *58*(2), 209-218.
- Miranda-Valverde, E., Valerio-Aguilar, D., Hernández-Gabarain, H. J., Chaves-Araya, C., Peralta-Azofeifa, M., Campos, L. E. C., ... & Morales-Martínez, F. (2014). Memory clinic experience under a social security health system in Costa Rica. *Dementia & Neuropsychologia*, *8*(4), 371-375.
- Mizutani, Y., Kihara, A., & Igarashi, Y. (2005). Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *Biochemical Journal*, *390*(1), 263-271.
- Morris, J. C. (1997). Clinical dementia rating: a reliable and valid diagnostic and staging measure for dementia of the Alzheimer type. *International psychogeriatrics*, *9*(S1), 173-176.
- Morris, T. J., Butcher, L. M., Feber, A., Teschendorff, A. E., Chakravarthy, A. R., Wojdacz, T. K., & Beck, S. (2013). ChAMP: 450k chip analysis methylation pipeline. *Bioinformatics*, *30*(3), 428-430.
- Myers, A. J., & Nemeroff, C. B. (2012). APOE: a risk factor for multiple disorders. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, *20*(7), 545-548.
- Nakao, M. (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*, *278*(1), 25-31.
- Nee, L. E., & Lippa, C. F. (1999). Alzheimer's disease in 22 twin pairs—13-year follow-up: hormonal, infectious and traumatic factors. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, *10*(2), 148-151.
- Nicolia, V., Fuso, A., Cavallaro, R. A., Di Luzio, A., & Scarpa, S. (2010). B vitamin deficiency promotes tau phosphorylation through regulation of GSK3 $\beta$  and PP2A. *Journal of Alzheimer's Disease*, *19*(3), 895-907.

- Norton, S., Matthews, F. E., Barnes, D. E., Yaffe, K., & Brayne, C. (2014). Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *The Lancet Neurology*, *13*(8), 788-794.
- Nuutinen, T., Suuronen, T., Kauppinen, A., & Salminen, A. (2009). Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain research reviews*, *61*(2), 89-104.
- Peters, T., Peters, M. T., biocViews DifferentialMethylation, G., GenomeAnnotation, D., OneChannel, T., & MultipleComparison, Q. (2016). Package 'DMRcate'.
- Profenno, L. A., Porsteinsson, A. P., & Faraone, S. V. (2010). Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biological psychiatry*, *67*(6), 505-512.
- Radner, F. P., Marrakchi, S., Kirchmeier, P., Kim, G. J., Ribierre, F., Kamoun, B., ... & Heilig, R. (2013). Mutations in CERS3 cause autosomal recessive congenital ichthyosis in humans. *PLoS genetics*, *9*(6), e1003536.
- Rao, J. S., Keleshian, V. L., Klein, S., & Rapoport, S. I. (2012). Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Translational psychiatry*, *2*(7), e132.
- Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, *7*(3), 137.
- Reitz, C., Tang, M. X., Miller, J., Green, R., & Luchsinger, J. A. (2009). Plasma homocysteine and risk of mild cognitive impairment. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, *27*(1), 11-17.
- Riebeling, C., Allegood, J. C., Wang, E., Merrill, A. H., & Futerman, A. H. (2003). Two mammalian longevity assurance gene (LAG1) family members, trh1 and trh4, regulate dihydroceramide synthesis using different fatty acyl-CoA donors. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(44), 43452-43459.
- Rosero-Bixby, L. (2008). The exceptionally high life expectancy of Costa Rican nonagenarians. *Demography*, *45*(3), 673-691.

- Rosero-Bixby, L., & Dow, W. H. (2009). Surprising SES gradients in mortality, health, and biomarkers in a Latin American population of adults. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences*, *64*(1), 105-117.
- Sanchez-Mut, J. V., & Gräff, J. (2015). Epigenetic alterations in Alzheimer's disease. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *9*, 347.
- Sánchez-Mut, J. V., Aso, E., Panayotis, N., Lott, I., Dierssen, M., Rabano, A., ... & Balint, B. (2013). DNA methylation map of mouse and human brain identifies target genes in Alzheimer's disease. *Brain*, *136*(10), 3018-3027.
- Sanchez-Mut, J. V., Heyn, H., Silva, B. A., Dixsaut, L., Garcia-Esparcia, P., Vidal, E., ... & Ferrer, I. (2018). PM20D1 is a quantitative trait locus associated with Alzheimer's disease. *Nature medicine*, *24*(5), 598.
- Sánchez-Mut, J. V., Heyn, H., Vidal, E., Moran, S., Sayols, S., Delgado-Morales, R., ... & de Lagran, M. M. (2016). Human DNA methylomes of neurodegenerative diseases show common epigenomic patterns. *Translational psychiatry*, *6*(1), e718.
- Sánchez - Mut, J. V., Aso, E., Heyn, H., Matsuda, T., Bock, C., Ferrer, I., & Esteller, M. (2014). Promoter hypermethylation of the phosphatase DUSP22 mediates PKA - dependent TAU phosphorylation and CREB activation in Alzheimer's disease. *Hippocampus*, *24*(4), 363-368.
- Saura, C. A., & Valero, J. (2011). The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Reviews in the neurosciences*, *22*(2), 153-169.
- Scacchi, R., De Bernardini, L., Mantuano, E., Donini, L. M., Vilardo, T., & Corbo, R. M. (1995). Apolipoprotein E (APOE) allele frequencies in late-onset sporadic Alzheimer's disease (AD), mixed dementia and vascular dementia: lack of association of  $\epsilon 4$  allele with AD in Italian octogenarian patients. *Neuroscience letters*, *201*(3), 231-234.
- Scarmeas, N., Luchsinger, J. A., Schupf, N., Brickman, A. M., Cosentino, S., Tang, M. X., & Stern, Y. (2009). Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *Jama*, *302*(6), 627-637.

- Schellenberg, G. D., Bird, T. D., Wijsman, E. M., Orr, H. T., Anderson, L., Nemens, E., ... & Potter, H. (1992). Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*, 668-668.
- Shen, J., & Kelleher, R. J. (2007). The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(2), 403-409.
- Siegmund, K. D., Connor, C. M., Campan, M., Long, T. I., Weisenberger, D. J., Biniszkiwicz, D., ... & Akbarian, S. (2007). DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PloS one*, 2(9), e895.
- Silverman, J. M., & Schmeidler, J. (2018). The protected survivor model: using resistant successful cognitive aging to identify protection in the very old. *Medical hypotheses*, 110, 9-14.
- Silverman, J. M., Schnaider-Beri, M., Grossman, H. T., Schmeidler, J., Wang, J. Y., & Lally, R. C. (2008). A phenotype for genetic studies of successful cognitive aging. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 147(2), 167-173.
- Simon-Sanchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., ... & Krüger, R. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature genetics*, 41(12), 1308.
- Simon, J., Arthur, C., Fong, A. L., Dwyer, J. M., Davare, M., Reese, E., ... & Impey, S. (2004). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *Journal of Neuroscience*, 24(18), 4324-4332.
- Singh, P. P., Singh, M., & Mastana, S. S. (2006). APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. *Annals of human biology*, 33(3), 279-308.
- Spiegel, A. M., Sewal, A. S., & Rapp, P. R. (2014). Epigenetic contributions to cognitive aging: disentangling mindspan and lifespan. *Learning & Memory*, 21(10), 569-574.

- Suri, S., Heise, V., Trachtenberg, A. J., & Mackay, C. E. (2013). The forgotten APOE allele: a review of the evidence and suggested mechanisms for the protective effect of APOE  $\epsilon$ 2. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(10), 2878-2886.
- Tohgi, H., Utsugisawa, K., Nagane, Y., Yoshimura, M., Ukitsu, M., & Genda, Y. (1999). The methylation status of cytosines in a  $\tau$  gene promoter region alters with age to downregulate transcriptional activity in human cerebral cortex. *Neuroscience letters*, 275(2), 89-92.
- Tylee, D. S., Kawaguchi, D. M., & Glatt, S. J. (2013). On the outside, looking in: A review and evaluation of the comparability of blood and brain “-omes”. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 162(7), 595-603.
- Valerio, D., Raventos, H., Schmeidler, J., Beeri, M. S., Villalobos, L. M., Bolaños-Palmieri, P., ... & Silverman, J. M. (2014). Association of apolipoprotein E-e4 and dementia declines with age. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 22(10), 957-960.
- Valerio, D., Raventós, H., Schmeidler, J., Beeri, M. S., Villalobos, L. M., Bolaños-Palmieri, P., ... & Silverman, J. M. (2014). Association of apolipoprotein E-e4 and dementia declines with age. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 22(10), 957-960.
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience*, 2(3), 266.
- Vemuri, P., Knopman, D. S., Lesnick, T. G., Przybelski, S. A., Mielke, M. M., Graff-Radford, J., ... & Machulda, M. M. (2017). Evaluation of amyloid protective factors and Alzheimer disease neurodegeneration protective factors in elderly individuals. *JAMA neurology*, 74(6), 718-726.
- Wang, D., Yan, L., Hu, Q., Sucheston, L. E., Higgins, M. J., Ambrosone, C. B., ... & Liu, S. (2012). IMA: an R package for high-throughput analysis of Illumina's 450K Infinium methylation data. *Bioinformatics*, 28(5), 729-730.
- Wang, S. C., Oelze, B., & Schumacher, A. (2008). Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS one*, 3(7), e2698.



- Wong, G. W., Yasuda, S., Madhusudhan, M. S., Li, L., Yang, Y., Krilis, S. A., ... & Stevens, R. L. (2001). Human tryptase  $\epsilon$  (PRSS22), a new member of the chromosome 16p13.3 family of human serine proteases expressed in airway epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 49169-49182.
- Wright, M. L., Dozmorov, M. G., Wolen, A. R., Jackson-Cook, C., Starkweather, A. R., Lyon, D. E., & York, T. P. (2016). Establishing an analytic pipeline for genome-wide DNA methylation. *Clinical epigenetics*, 8(1), 45.
- Yu, L., Chibnik, L. B., Srivastava, G. P., Pochet, N., Yang, J., Xu, J., ... & Meissner, A. (2015). Association of brain DNA methylation in SORL1, ABCA7, HLA-DRB5, SLC24A4, and BIN1 with pathological diagnosis of Alzheimer disease. *JAMA neurology*, 72(1), 15-24.
- Zhang, Z., Gutierrez, D., Li, X., Bidlack, F., Cao, H., Wang, J., ... & Amendt, B. A. (2013). The LIM Homeodomain Transcription Factor LHX6 a transcriptional repressor that interacts with pituitary homeobox 2 (PITX2) to regulate odontogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2485-2500.