

Convocatoria Intramural de Proyectos de Investigación de la Asociación Galbán

Título: “Estudio de la edad epigenética en largos supervivientes de cáncer pediátrico y su utilidad clínica”

Resumen

Aunque las tasas de supervivencia han aumentado durante los últimos años gracias a los avances clínicos, los largos supervivientes de cáncer infantil corren el riesgo de sufrir los efectos adversos relacionados con su tratamiento oncológico, y además presentan un fenotipo de envejecimiento acelerado respecto a individuos sanos de edad similar. Por lo tanto, la identificación de biomarcadores moleculares de envejecimiento prematuro entre estos pacientes se convierte en una prioridad tanto para la prevención como para su tratamiento. En este proyecto piloto planteamos investigar las alteraciones de la metilación del ADN de largos supervivientes de cáncer infantil, y lo más importante, el papel de los relojes epigenéticos basados en la metilación del ADN como biomarcadores pronóstico y diagnóstico de envejecimiento acelerado que nos permitan establecer estrategias preventivas para controlar o contrarrestar sus efectos negativos en la salud.

Equipo investigador

El equipo de investigación estará formado por la doctora Rocío González Urdinguio como IP, y los doctores Mario Fernández Fraga, Agustín Fernández Fernández y Juan Ramón Tejedor, todos ellos integrantes del grupo de Epigenética del Cáncer y Nanomedicina del ISPA-CSIC. Este equipo investigador tiene una amplia experiencia en el campo de la epigenética y epigenómica, de la biología celular, molecular y computacional, y sus componentes disponen del conocimiento necesario para el desarrollo de este proyecto. Cabe destacar que, en el campo de la epigenética del cáncer, nuestro equipo fue pionero en la identificación de la pérdida de metilación del ADN genómico que implica la activación de genes clave en la respuesta inmune antitumoral (Urdinguio, Fernandez et al. 2013).

La Dra. Rocío G. Urdinguio ha trabajado en el campo de la Epigenética durante 16 años y actualmente es investigadora del CIBERER. Tras su doctorado en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, ha desarrollado varios proyectos sobre los mecanismos epigenéticos relacionados con cáncer, desarrollo y envejecimiento. Rocío ha participado en proyectos de investigación competitivos nacionales (13) e internacionales (2). Relativo al cáncer infantil cabe destacar que fue financiada durante 4 años por un proyecto de la Fundación AECC, “Alteraciones epigenéticas de las histonas en leucemias infantiles. Tratamiento con fármacos

epigenéticos”, y los resultados se publicaron recientemente en *Nucleic acids research* (Urdinguio, Lopez et al. 2019). Hasta la fecha, ha publicado 31 artículos y 5 capítulos de libro, es revisora habitual para las revistas científicas “*Scientific reports*” y “*Plos ONE*” y miembro asociado de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), constituyente de la sociedad FEBS (Federation of European Biochemical Societies). Esta experiencia en los campos de la epigenética y del cáncer (en particular del infantil), y haber desarrollado múltiples colaboraciones y proyectos nacionales e internacionales, sitúan a esta IP novel con una visión del tema propuesto que facilita que se pueda llevar a cabo de forma satisfactoria.

Los doctores Mario F Fraga, profesor de investigación del CSIC (índice h >70), y el Agustín F Fernández, científico titular del CSIC (índice h >40), llevan más de 15 años trabajando en el campo de la epigenética, y son expertos en el campo de la epigenética y la epigenómica del cáncer en particular, donde han publicado decenas de artículos de investigación en las más prestigiosas revistas internacionales como por ejemplo “*Molecular Cancer*”, “*Cancer Research*” o “*Genome Research*”, entre otras. Los doctores Fraga y Fernández son editores y revisores de varias publicaciones científicas internacionales, miembros de varias sociedades científicas, revisores habituales para agencias de evaluación de la investigación nacionales e internacionales, y miembros de comités científicos españoles y europeos. El interés de sus trabajos en el campo del cáncer ha merecido la financiación ininterrumpida del ISCIII durante los últimos 15 años, y la traslación de los resultados de sus trabajos en el campo del cáncer se ponen de manifiesto en uno de los proyectos actuales financiados por la fundación AECC (“Mejora del rendimiento diagnóstico de la citología mediante punción aspirativa con aguja fina (PAAF) para el diagnóstico precoz del carcinoma folicular de tiroides”) donde se buscan biomarcadores epigenéticos para el diagnóstico y priorización de pacientes de cáncer de tiroides con diferentes grados de malignidad.

El Dr. Juan Ramón Tejedor es un investigador Juan de la Cierva incorporación del ISPA-CSIC, experto en biología molecular y celular, así como en el desarrollo de análisis computacionales. Tiene gran experiencia en el análisis de datos de ultra-secuenciación y en la integración de conjuntos de datos de ómicos (epigenómica-transcriptómica), y es autor de múltiples estudios a nivel de genoma completo en revistas de relevantes a nivel internacional. Cabe destacar un trabajo reciente sobre alteraciones epigenómicas en cáncer infantil publicado en *Journal of Clinical Investigation* (Tejedor, Bueno et al. 2021), donde los miembros de este equipo investigador identificaron alteraciones moleculares clave para entender mejor la leucemia linfática aguda en bebés, y establecieron un punto de partida para nuevas intervenciones terapéuticas.

Estado actual del tema

La causa más frecuente de mortalidad pediátrica en los países desarrollados es el cáncer. Aunque durante los últimos años las tasas de supervivencia han aumentado gracias a los avances en los tratamientos, la población de supervivientes de cáncer pediátrico se enfrenta a altos riesgos de morbilidad, o de aparición de una enfermedad grave 20 años después del diagnóstico (Oeffinger, Mertens et al. 2006, Yeh, Ward et al. 2020).

Los largos supervivientes de cáncer infantil corren el riesgo de sufrir los efectos adversos relacionados con el tratamiento, incluida una amplia gama de complicaciones en la salud y enfermedades crónicas (Bhakta, Liu et al. 2017), y además un fenotipo de envejecimiento acelerado respecto a individuos sanos de edad similar (Fried, Tangen et al. 2001, Armstrong, Kawashima et al. 2014). Por lo tanto, la identificación de biomarcadores moleculares de envejecimiento prematuro entre los largos supervivientes de cáncer infantil se convierte en una prioridad tanto para la prevención como para el manejo clínico de estos pacientes.

Podemos definir el envejecimiento como “el declive funcional dependiente del tiempo que afecta a la mayoría de los organismos vivos” (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013). Es un proceso complejo y progresivo que se caracteriza por diversos cambios tanto a nivel molecular como celular, como el acortamiento de los telómeros, la disfunción mitocondrial y las alteraciones epigenéticas (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013). Además, el envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de diferentes enfermedades incluido el cáncer, por lo que, como mencionamos anteriormente, una de las claves para poder estudiarlo en profundidad es encontrar una buena herramienta que lo mida de forma objetiva. Aunque inicialmente se consideró la longitud de los telómeros un buen biomarcador de envejecimiento, en la actualidad se han identificado otras herramientas moleculares, entre las que más destacan las basadas en la información epigenética/epigenómica (Jansen, Han et al. 2021). Estos primeros “relojes epigenéticos” son capaces de medir con gran exactitud la edad cronológica, y lo que es más importantes identificar alteraciones de la edad biológica respecto a la cronológica (Horvath 2013). Es precisamente esa discrepancia entre la “edad epigenética” medida por estos relojes moleculares y la “edad cronológica”, lo que podemos utilizar como indicador la tasa de envejecimiento o del estado de salud general de un individuo (Horvath 2013). Para rastrear tales cambios epigenéticos dependientes de la edad, se han propuesto varios “relojes epigenéticos” basados en la metilación del ADN, que, además de para medir la edad biológica de un individuo se pueden usar para estudiar el impacto de una enfermedad en la salud humana. Han aparecido varios los “relojes epigenéticos” basados en la metilación del ADN entre los que destacan el “pan tissue” (Horvath 2013), el “GrimAge” (Lu, Quach et al. 2019), y el “PhenoAge” (Levine, Lu et al. 2018). Y es precisamente este último reloj epigenético de Levine el que proporciona una medida más precisa en este tipo de relojes biológicos en cuanto a riesgo de mortalidad, esperanza de vida, y salud en la población general (Levine, Lu et al. 2018).

Adicionalmente a su papel como herramienta o biomarcador para la medida del envejecimiento biológico, se ha demostrado que las marcas epigenéticas como la metilación del ADN, desempeñan un papel importante en la interacción entre los factores externos y la respuesta genética y fisiológica (Feil and Fraga 2012), por lo que su estudio sería de interés tanto para la definición de posibles biomarcadores de la enfermedad como para arrojar luz sobre los mecanismos moleculares de los largos supervivientes de cáncer pediátricos expuestos a duros tratamientos oncológicos. En este sentido, la metilación del ADN se ha estudiado en otras enfermedades a escala genómica (Urdinguio, Sanchez-Mut et al. 2009, Fernandez, Assenov et al. 2012, Urdinguio, Bayon et al. 2015, Tejedor, Bueno et al. 2021), pero se sabe poco sobre la respuesta epigenética en largos supervivientes de cáncer pediátricos después de la enfermedad, y cómo estos cambios podrían estar relacionados con complicaciones en la salud.

Por todo lo expuesto anteriormente proponemos un estudio piloto, con un número limitado de muestras, para caracterizar las alteraciones de la metilación del ADN a nivel de genoma

completo en largos supervivientes de cáncer pediátrico respecto a controles sin cáncer, y analizar las alteraciones en la edad biológica que nos permita utilizar los relojes epigenéticos para identificar a pacientes con mayor riesgo de envejecimiento acelerado, y así poder buscar estrategias de prevención y control de los efectos adversos en la salud que esto implica.

Originalidad del proyecto e impacto potencial sobre el sistema de salud

En este proyecto piloto se plantea, por primera vez, una aproximación a nivel de “genoma completo” para estudiar las alteraciones epigenéticas de largos supervivientes de cáncer infantil. La utilización de herramientas de análisis de última generación (arrays de metilación *Infinium MethylationEPIC*) nos permitirá identificar las alteraciones epigenómicas asociadas al tratamiento oncológico que han recibido este tipo de pacientes desde su diagnóstico inicial hasta su edad adulta. Estos resultados son claves para identificar dianas moleculares sobre las cuales establecer nuevas estrategias de tratamiento que permitan mejorar la calidad de vida en largos supervivientes de cáncer pediátrico. Y lo más importante, la utilización de estas herramientas de análisis molecular nos proporcionará la información necesaria para medir la edad biológica (epigenética) de este tipo de pacientes, que fenotípicamente presentan un envejecimiento acelerado respecto a individuos sanos de su misma edad, y que parece estar asociado a los efectos a largo plazo de los tratamientos que reciben. La precisión de estos novedosos “relojes epigenéticos” nos dará información para establecer estrategias de control y ralentización de los efectos adversos del envejecimiento asociados a los tratamientos oncológicos.

El impacto de los resultados de este proyecto sobre el sistema de salud puede ser alto ya que el coste del tratamiento al diagnóstico y las complicaciones clínicas que se presentan a lo largo del tiempo son elevadas. Los análisis epigenómicos podrían por un lado, identificar alteraciones causadas por los tratamientos oncológicos específicos que podrían evitar complicaciones futuras, y por otro, proporcionar una medida predictiva de envejecimiento acelerado, y relativamente barata, que nos permitiría identificar grupos de pacientes con mayor riesgo a los que hacer seguimiento más personalizado, para garantizar el control y el manejo adecuado de la enfermedad en relación con el mantenimiento de un envejecimiento saludable.

Hipótesis y objetivos

La hipótesis que planteamos en este proyecto es que los pacientes largos supervivientes de cáncer pediátrico presentan alteraciones de la metilación del ADN y una edad epigenética acelerada respecto a individuos sanos.

Para resolver esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos.

- Caracterizar los patrones de metilación de ADN a nivel de genoma completo de largos supervivientes de cáncer pediátrico diagnosticados de leucemia linfocítica aguda (LLA), e identificar las diferencias con individuos sanos.
- Calcular y estudiar las diferencias de la edad epigenética entre los mismos pacientes e individuos sanos.

Materiales y métodos

Selección de pacientes y manejo de muestras

La recolección de todas las muestras utilizadas en este estudio se coordinará con el grupo de trabajo de Supervivientes de la Asociación de Familias de Niños con Cáncer del Principado de Asturias "Galbán" y el Hospital Materno-Infantil del Hospital Central Universitario de Asturias (HUCA). Inicialmente se analizarán el epigenoma completo (metilación del ADN) de 20 muestras de sangre de largos supervivientes de cáncer pediátrico diagnosticados de leucemia linfocítica aguda, uno de los tipos de cánceres pediátricos con más alta incidencia (Ward, DeSantis et al. 2014), y que hayan seguido una pauta similar de tratamiento. Como controles sanos se utilizarán los datos de individuos sanos (pareados en edad y sexo) obtenidos con los mismos arrays de metilación y publicados en The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) del National Cancer Institute.

Para las validaciones biológicas de los resultados obtenidos a nivel de genoma completo se analizarán mediante la pirosecuenciación de bisulfito 40 muestras adicionales.

Junto a cada muestra se recogerá la información clínica correspondiente a cada uno de los pacientes. El estudio dispondrá del consentimiento del Comité Ético del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) de acuerdo con: Universal Declaration of Human Rights; International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects, WHO-CIOMS/1992 y Law 41/20; BOE No 274 of November 15, 2002, y todos los participantes proporcionarán su consentimiento informado por escrito.

La obtención como el procesamiento del DNA de las muestras para los análisis epigenéticos y epigenómicos se realizará mediante métodos clásicos basados en la extracción con fenol/cloroformo.

Caracterización de los patrones de metilación del DNA mediante microarrays de última generación

Para el análisis de metilación del ADN se utilizará la plataforma del Infinium Human Methylation EPIC BeadChip Kit (850K) (Illumina Inc.). Esta tecnología de microarray de última generación, basada en el análisis de ADN modificado con bisulfito (conversión química de las citosinas no metiladas en uracilos), analiza más de 850.000 sitios CpG a resolución de un nucleótido. Cada 850K Infinium BeadChip Methylation puede procesar hasta 16 muestras a la vez y requerirá un mínimo de 500 ng de ADN modificado con bisulfito por muestra.

Es actualmente la herramienta más potente para estudiar la metilación del ADN a nivel genómico y que permite el análisis de gran número de muestras. A diferencia de otros métodos de análisis de metilación de todo el genoma, el 850k Infinium BeadChip no tienen que depender de Me-DIP (inmunoprecipitación de ADN metilado) y ofrece cobertura de todos los genes referenciados, incluyendo los promotores 5', y las regiones 3', de genes con y sin islas CpG. También permite el análisis de las recientemente descubiertas "CpG shores", las citosinas fuera de CpG metiladas en células madre, CpGs diferencialmente metiladas en tumores respecto a tejidos normales, CpG en islas CpG fuera de las regiones codificantes, regiones promotoras de miARN y regiones asociadas a enfermedades identificadas a través de GWAS. La novedad de esta versión de los arrays de Illumina es la cobertura de regiones reguladoras y enhancers del genoma.

La hibridación de las muestras en los arrays se realizará en el equipo de la Unidad de Genotipado del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid (o servicio similar) y los datos serán posteriormente analizados en nuestro laboratorio.

Análisis de los datos obtenidos de los arrays de metilación:

Preprocesamiento de datos de HumanMethylationEPIC Beadchip

Los archivos IDAT (datos brutos) obtenidos de la plataforma HumanMethylationEPIC Beadchip se procesarán utilizando el paquete R / Bioconductor minfi (v_1.22.1). Para ajustar las señales de los diferentes tipos de diseño de sonda presentes en la arquitectura HumanMethylationBeadchip, las señales rojas y verdes de los archivos IDAT se corregirán utilizando el algoritmo ssNOOB con los parámetros predeterminados. Se descartarán las siguientes sondas: i) sondas con variantes genéticas superpuestas (SNP137Common track del navegador del genoma UCSC), ii) sondas ubicadas en cromosomas sexuales, iii) sondas de reactividad cruzada y multimapping y iv) sondas con al menos una muestra con un valor de p de detección $> 0,01$. Se calcularán los valores Beta y M de acuerdo con el método de Du y colegas (BMC Bioinformatics 2010), y emplearán en todo el proceso de análisis. Los valores M se usarán para el análisis estadístico asumiendo homocedasticidad, mientras que los valores Beta se usarán principalmente para la interpretación intuitiva y visualización de los resultados, y para el análisis de correlación entre la metilación del ADN y la expresión génica.

Corrección del batch effect

Se empleará el Análisis de Variables Subrogadas (SVA) para capturar la heterogeneidad de los datos de metilación subyacentes y para tener en cuenta los posibles batch effect o las variables de confusión que podrían ser de interés. Los coeficientes de las variables subrogadas detectadas (SV) se agregarán posteriormente a los datos fenotípicos y se incluirán en la definición del modelo para detectar sondas diferencialmente metiladas (DMP).

Identificación de sondas metiladas diferencialmente (DMPs)

La metilación diferencial significativa de una sonda específica entre grupos de muestras se determinará mediante la prueba t moderada implementada en el paquete R / Bioconductor limma (v_3.38.3). Se ajustarán los datos de metilación un modelo lineal, siendo el nivel de metilación la variable respuesta y el grupo de muestras la covariable principal de interés. Los SV generados mediante SVA también se incluirán en la definición del modelo. Cada contraste generará un valor p para cada sonda. Los valores p se corregirán por el método Benjamini-Hochberg para controlar el FDR. Se empleará un umbral de FDR de 0,05 y una diferencia absoluta mínima entre los valores medios de metilación del ADN de los grupos de 0,25 para determinar las DMPs.

Análisis de ontologías génicas

Utilizaremos el paquete R / Bioconductor missMethyl (versión 1.10.0) (Phipson et al., 2016) para realizar análisis de ontologías génicas. Con esta metodología, los sitios CpG se mapean primero a genes (Entrez IDs), que posteriormente se asociarán con ontologías específicas utilizando la base de datos de anotaciones contenida en el paquete R / Bioconductor GO.db (versión 3.4.1). Comprobaremos enriquecimientos significativos mediante la realización de pruebas

hipergeométricas unilaterales contra un fondo apropiado (las ontologías de los genes que contienen todos los CpG de la matriz de Illumina).

Cálculo de la edad epigenética

Las edades epigenéticas de las muestras analizadas en los arrays de metilación se estimarán mediante la herramienta “DNA Methylation Age Calculator” (<https://dnamage.genetics.ucla.edu/home>) para los relojes “pan tissue” (Horvath 2013), “GrimAge” (Lu, Quach et al. 2019) y “PhenoAge” (Levine, Lu et al. 2018). Para definir la aceleración de la edad epigenética, los valores predichos se volverán a medir según la edad cronológica y el sexo mediante un ajuste del modelo lineal. Los residuos obtenidos representan los valores de aceleración de la edad epigenética, que tienen en cuenta las diferencias cronológicas y de sexo.

Adicionalmente se analizará la edad epigenética de muestras adicionales mediante el análisis por pirosecuenciación de bisulfito de 3 CpGs identificadas en el estudio de Weidner y colaboradores (Weidner CI, et al., Genome Biology 2014).

Pirosecuenciación de bisulfito

La validación de los cambios de metilación del ADN más significativas encontradas en los análisis de los 850k Infinium BeadChips, y de las edades epigenéticas de 40 muestras adicionales se realizará mediante pirosecuenciación de bisulfito. Se diseñarán los cebadores específicos cubriendo los mismos sitios CpG explorados por la plataforma de Illumina, y las 3 CpGs indicadas por Weidner y colaboradores (Weidner, Lin et al. 2014) para el cálculo de la edad epigenética. Se analizará la correlación entre los valores de metilación obtenidos mediante el microarray y la pirosecuenciación. Previo a la pirosecuenciación se realizará la modificación con bisulfito del ADN con el EZ™ Kit (Zymo Research Corporation) siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN tratado con bisulfito se diluye en 15 volúmenes con 2µl para cada PCR. El conjunto de cebadores para la amplificación por PCR y secuenciación se diseñarán con software específico (PyroMark versión 2.0.01.15). La PCR se realizará con los cebadores biotinilados para convertir el producto amplificado en ADN de cadena simple. Se utilizará el kit de vacío Tool™ (Biotage) para preparar ADN de cadena simple de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones Pirosecuenciación y cuantificación de la metilación se realizarán en una versión 2.0.6 del sistema PyroMark P24 (Qiagen).

Presupuesto

A continuación se describe un presupuesto pormenorizado de los costes asociados al proyecto durante los 12 meses de ejecución. La obtención y el procesamiento de las muestras y los arrays de metilación se realizarán durante los 4 primeros meses. Durante los 6 meses siguientes se analizarán los datos y se identificarán posibles candidatos que se validarán junto al cálculo de las edades epigenéticas mediante pirosecuenciación de bisulfito.

Costes de ejecución	
Bienes y servicios	
- Procesamiento y preparación de muestras biológicas a partir de sangre periférica (n: 50)	500 €
- <i>El procesamiento de muestras para los arrays de metilación EPIC de Illumina se realizará en nuestro laboratorio (consumibles). Los datos brutos (idat) se obtendrán en instituciones o empresas externas (CEGEN) pero los análisis se realizarán internamente.</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Arrays de metilación humanos EPIC Illumina: 20 muestras 	8.000 €
- Pirosecuenciación de bisulfito (validaciones técnicas y biológicas/edad epigenética)	
<ul style="list-style-type: none"> • EZ DNA Methylation-Gold Kit™, • PyroMark Gold Q24 reagents (Qiagen) 	1.500 €
TOTAL	10.000 €

Referencias

- Armstrong, G. T., T. Kawashima, W. Leisenring, K. Stratton, M. Stovall, M. M. Hudson, C. A. Sklar, L. L. Robison and K. C. Oeffinger (2014). "Aging and risk of severe, disabling, life-threatening, and fatal events in the childhood cancer survivor study." *J Clin Oncol* **32**(12): 1218-1227.
- Bhakta, N., Q. Liu, K. K. Ness, M. Baassiri, H. Eissa, F. Yeo, W. Chemaitilly, M. J. Ehrhardt, J. Bass, M. W. Bishop, K. Shelton, L. Lu, S. Huang, Z. Li, E. Caron, J. Lanctot, C. Howell, T. Folse, V. Joshi, D. M. Green, D. A. Mulrooney, G. T. Armstrong, K. R. Krull, T. M. Brinkman, R. B. Khan, D. K. Srivastava, M. M. Hudson, Y. Yasui and L. L. Robison (2017). "The cumulative burden of surviving childhood cancer: an initial report from the St Jude Lifetime Cohort Study (SJLIFE)." *Lancet* **390**(10112): 2569-2582.
- Feil, R. and M. F. Fraga (2012). "Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications." *Nat Rev Genet* **13**(2): 97-109.
- Fernandez, A. F., Y. Assenov, J. I. Martin-Subero, B. Balint, R. Siebert, H. Taniguchi, H. Yamamoto, M. Hidalgo, A. C. Tan, O. Galm, I. Ferrer, M. Sanchez-Cespedes, A. Villanueva, J. Carmona, J. V. Sanchez-Mut, M. Berdasco, V. Moreno, G. Capella, D. Monk, E. Ballestar, S. Roper, R. Martinez, M. Sanchez-Carbayo, F. Prosper, X. Agirre, M. F. Fraga, O. Grana, L. Perez-Jurado, J. Mora, S. Puig, J. Prat, L. Badimon, A. A. Puca, S. J. Meltzer, T. Lengauer, J. Bridgewater, C.

- Bock and M. Esteller (2012). "A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples." Genome Res **22**(2): 407-419.
- Fried, L. P., C. M. Tangen, J. Walston, A. B. Newman, C. Hirsch, J. Gottdiener, T. Seeman, R. Tracy, W. J. Kop, G. Burke, M. A. McBurnie and G. Cardiovascular Health Study Collaborative Research (2001). "Frailty in older adults: evidence for a phenotype." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **56**(3): M146-156.
- Horvath, S. (2013). "DNA methylation age of human tissues and cell types." Genome Biol **14**(10): R115.
- Jansen, R., L. K. Han, J. E. Verhoeven, K. A. Aberg, E. C. van den Oord, Y. Milaneschi and B. W. Penninx (2021). "An integrative study of five biological clocks in somatic and mental health." Elife **10**.
- Levine, M. E., A. T. Lu, A. Quach, B. H. Chen, T. L. Assimes, S. Bandinelli, L. Hou, A. A. Baccarelli, J. D. Stewart, Y. Li, E. A. Whitsel, J. G. Wilson, A. P. Reiner, A. Aviv, K. Lohman, Y. Liu, L. Ferrucci and S. Horvath (2018). "An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan." Aging (Albany NY) **10**(4): 573-591.
- Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer (2013). "The hallmarks of aging." Cell **153**(6): 1194-1217.
- Lu, A. T., A. Quach, J. G. Wilson, A. P. Reiner, A. Aviv, K. Raj, L. Hou, A. A. Baccarelli, Y. Li, J. D. Stewart, E. A. Whitsel, T. L. Assimes, L. Ferrucci and S. Horvath (2019). "DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan." Aging (Albany NY) **11**(2): 303-327.
- Oeffinger, K. C., A. C. Mertens, C. A. Sklar, T. Kawashima, M. M. Hudson, A. T. Meadows, D. L. Friedman, N. Marina, W. Hobbie, N. S. Kadan-Lottick, C. L. Schwartz, W. Leisenring, L. L. Robison and S. Childhood Cancer Survivor (2006). "Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer." N Engl J Med **355**(15): 1572-1582.
- Tejedor, J. R., C. Bueno, M. Vinyoles, P. Petazzi, A. Agraz-Doblas, I. Cobo, R. Torres-Ruiz, G. F. Bayon, R. F. Perez, S. Lopez-Tamargo, F. Gutierrez-Aguera, P. Santamarina-Ojeda, M. Ramirez-Orellana, M. Bardini, G. Cazzaniga, P. Ballerini, P. Schneider, R. W. Stam, I. Varela, M. F. Fraga, A. F. Fernandez and P. Menendez (2021). "Integrative methylome-transcriptome analysis unravels cancer cell vulnerabilities in infant MLL-rearranged B cell acute lymphoblastic leukemia." J Clin Invest **131**(13).
- Urduinguio, R. G., G. F. Bayon, M. Dmitrijeva, E. G. Torano, C. Bravo, M. F. Fraga, L. Bassas, S. Larriba and A. F. Fernandez (2015). "Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility." Hum Reprod **30**(5): 1014-1028.
- Urduinguio, R. G., A. F. Fernandez, A. Moncada-Pazos, C. Huidobro, R. M. Rodriguez, C. Ferrero, P. Martinez-Camblor, A. J. Obaya, T. Bernal, A. Parra-Blanco, L. Rodrigo, M. Santacana, X. Matias-Guiu, B. Soldevilla, G. Dominguez, F. Bonilla, S. Cal, C. Lopez-Otin and M. F. Fraga (2013). "Immune-dependent and independent antitumor activity of GM-CSF aberrantly expressed by mouse and human colorectal tumors." Cancer Res **73**(1): 395-405.
- Urduinguio, R. G., V. Lopez, G. F. Bayon, R. Diaz de la Guardia, M. I. Sierra, E. Garcia-Torano, R. F. Perez, M. G. Garcia, A. Carella, P. C. Pruneda, C. Prieto, M. Dmitrijeva, P. Santamarina, T. Belmonte, C. Mangas, E. Diaconu, C. Ferrero, J. R. Tejedor, J. L. Fernandez-Morera, C. Bravo, C. Bueno, A. Sanjuan-Pla, R. M. Rodriguez, B. Suarez-Alvarez, C. Lopez-Larrea, T. Bernal, E. Colado, M. Balbin, O. Garcia-Suarez, M. D. Chiara, I. Saenz-de-Santa-Maria, F. Rodriguez, A. Pando-Sandoval, L. Rodrigo, L. Santos, A. Salas, J. Vallejo-Diaz, C. C. A, D. Rico, I. Hernandez-Lopez, A. Vaya, J. M. Ricart, E. Seto, N. Sima-Teruel, A. Vaquero, L. Villedor, M. J. Canal, D. Pisano, O. Grana-Castro, T. Thomas, A. K. Voss, P. Menendez, A. Villar-Garea, R. Deutzmann, A. F. Fernandez and M. F. Fraga (2019). "Chromatin regulation by Histone H4 acetylation at Lysine 16 during cell death and differentiation in the myeloid compartment." Nucleic Acids Res **47**(10): 5016-5037.
- Urduinguio, R. G., J. V. Sanchez-Mut and M. Esteller (2009). "Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies." Lancet Neurol **8**(11): 1056-1072.

- Ward, E., C. DeSantis, A. Robbins, B. Kohler and A. Jemal (2014). "Childhood and adolescent cancer statistics, 2014." *CA Cancer J Clin* **64**(2): 83-103.
- Weidner, C. I., Q. Lin, C. M. Koch, L. Eisele, F. Beier, P. Ziegler, D. O. Bauerschlag, K. H. Jockel, R. Erbel, T. W. Muhleisen, M. Zenke, T. H. Brummendorf and W. Wagner (2014). "Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites." *Genome Biol* **15**(2): R24.
- Yeh, J. M., Z. J. Ward, A. Chaudhry, Q. Liu, Y. Yasui, G. T. Armstrong, T. M. Gibson, R. Howell, M. M. Hudson, K. R. Krull, W. M. Leisenring, K. C. Oeffinger and L. Diller (2020). "Life Expectancy of Adult Survivors of Childhood Cancer Over 3 Decades." *JAMA Oncol* **6**(3): 350-357.