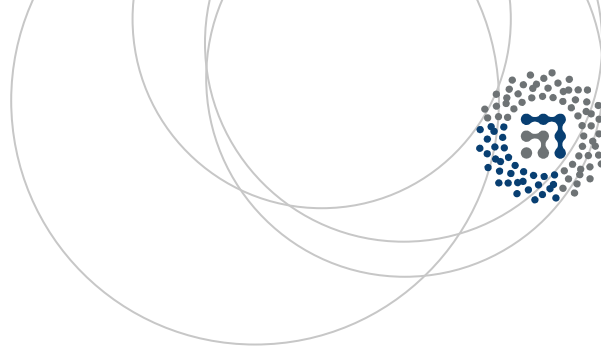


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Variantes genéticas en *ANRIL* y longevidad

Autor:

Jaione Auzmendi Iriarte

Director/a:

Dra. África García-Orad Carles

Co-director/a:

Dra. Idoia Martín Guerrero

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENVEJECIMIENTO.....	1
1.2. LONGEVIDAD	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO	5
3.2. SELECCIÓN DE SNPs	6
3.3. GENOTIPADO DE SNPs.....	6
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	7
4. RESULTADOS.....	8
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA Y SNPs	8
4.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS tag-SNPs Y LONGEVIDAD	9
5. DISCUSIÓN	11
6. CONCLUSIÓN.....	12
7. BIBLIOGRAFÍA	12

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso que está asociado a un deterioro progresivo en las funciones celulares, tisulares y las relacionadas con los órganos. En muchos casos, ha sido descrito como la colección de cambios que reducen la longevidad de un individuo (Kolovou, G.D., et al., 2014). Por tanto, podría considerarse que los procesos que inducen el envejecimiento, disminuyen la longevidad.

1.2. LONGEVIDAD

La investigación en torno al envejecimiento y la longevidad ha cobrado interés debido al incremento en la media de la esperanza de vida, lo que ha elevado el porcentaje de los individuos de edad avanzada dentro de la población (Weinert, B.T. y Timiras, P.S., 2003). Hace dos siglos, la esperanza de vida humana estaba por debajo de los 40 años, mientras que hoy en día, en los países desarrollados, se han llegado a superar los 80 años (<http://www.mortality.org>).

Se han descrito diferentes factores que influyen en la longevidad de un individuo: los factores ambientales y los factores genéticos. En relación a los factores ambientales, es importante mantener una forma de vida saludable, es decir, tener una dieta equilibrada, hacer ejercicio, etc. En cuanto a los factores genéticos, varios estudios realizados en gemelos han demostrado que aproximadamente un 25-32% de la diferencia en la esperanza de vida es debida a la variación genética (Iachine, I., et al., 2006).

Hasta el momento, son muchos los estudios realizados analizando el componente genético de la longevidad. La mayoría de estos estudios se han centrado en el análisis de variantes genéticas en genes codificantes (**Tabla 1**).

Tabla 1. Listado de los genes codificantes más estudiados en relación al proceso de envejecimiento-longevidad. Tabla adaptada de Kolovou, G.D., et al., 2014. CDKN2A/CDKN2B, Inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina A y B. CETP, Proteína transportadora de colesterol ester. Vía IGF, genes implicados en la vía del factor de crecimiento insulínico. Familia FOXO, Factores de transcripción de tipo "Forkhead box O". ACE, Enzima convertidor de angiotensina I. SIRT1, Sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD. APOE, Apolipoproteína E.

Gen	Ejemplos de variantes estudiadas	Referencias
CDKN2A/CDKN2B	rs2811712	(Melzer, D., 2008)
CETP	rs708272, rs5882	(Kolovou, G., et al., 2014)
Vía IGF	rs945649, rs3842755	(Soerensen, M., et al., 2012)
Familia FOXO	rs2701893, rs12013673, rs7539614	(Kleindorp, R., et al., 2011)
ACE	rs1799752	(Kolovou, G., et al., 2014)
SIRT 1	rs7896005	(Kim, S., et al., 2012)
APOE	rs2075650	(Schupf, N., et al., 2013)

Hoy día, gracias al Proyecto del Genoma Humano, sabemos que los genes que codifican para proteínas constituyen solo aproximadamente el 1,5% de todo el genoma (Esteller, M., 2011). En 2007, gracias al proyecto "*ENCyclopedia Of DNA Elements*" (ENCODE), se supo que más del 80 % de nuestro genoma se transcribe; existen al menos 22.411 ARNs no codificantes (en inglés, "*non coding RNAs*" – ncRNAs –) que participan en la regulación de al menos el 60 % de los genes codificantes para proteínas (Esteller, M., 2011).

Los ncRNAs se clasifican por tamaño, de tal manera que se distinguen ncRNAs cortos, largos y los de tamaño medio. Entre ellos, los ncRNAs largos, en inglés "*long non coding RNAs*" (lncRNAs), son los que en los últimos años están despertando un gran interés.

Los lncRNAs son moléculas de ARN de más de 200 nucleótidos que no codifican proteínas (Qureshi, I.A. y Mehler, M.F., 2013), pero que sin embargo, ejercen funciones de regulación (**Figura 1**).

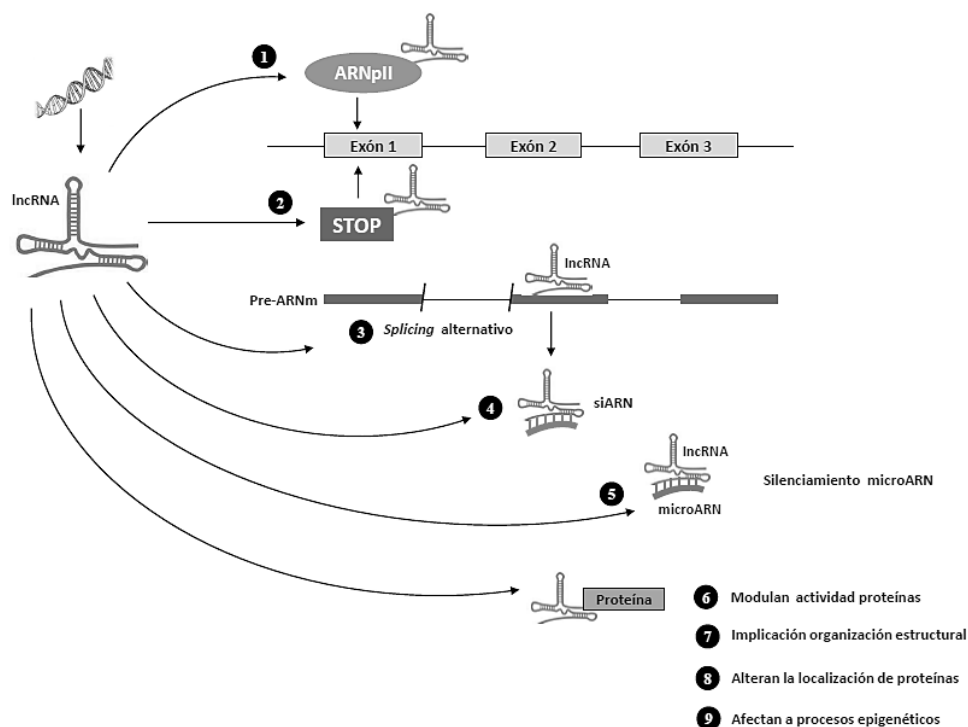


Figura 1. Funciones de los lncRNAs (Sana, J., et al., 2012). Afectan positivamente o negativamente a la expresión de un gen (1) inhibiendo la unión de la ARN polimerasa II o (2) induciendo la remodelación de la cromatina; (3) bloquean el reconocimiento de las zonas de "corte y empalme" (*splicing*) por el espliciosoma, hibridándose al pre-ARNm; (4) generan ARNs pequeños de interferencia; (5) silencian la función de microARNs, uniéndose a ellos; (6) modulan la actividad de una proteína, uniéndose a ella; (7) participan en la organización estructural de la célula; (8) alteran la localización de las proteínas en la célula y (9) afectan a los procesos epigenéticos.

Los lncRNAs actúan en procesos como la proliferación, diferenciación, quiescencia, senescencia, respuesta celular a estrés o a agentes inmunogénicos, y muchos otros que pueden resultar relevantes en la biología del envejecimiento y longevidad (**Tabla 2**).

Tabla 2. Listado de lncRNAs reguladores de procesos que se ven alterados en el proceso de envejecimiento.

Función	Ejemplos de lncRNA	Referencias
Controlar la proliferación y senescencia	<i>MALAT1</i>	(Tripathi, V., et al., 2013)
	<i>ANRIL</i>	(Kotake, Y., et al., 2011)
Controlar los cambios epigenéticos	<i>ANRIL</i>	(Yap, K.L., et al., 2010)
	<i>Xist</i>	(Abdelmohsen, K., et al., 2013)
Controlar la función del telómero	<i>TERC</i>	(Samper, E., et al., 2001)
	<i>TERRA</i>	(Porro, A., et al., 2014)
Modular la función de las células madre	<i>linc-RoR</i>	(Loewer, S., et al., 2010)
Afectar en la proteostasis	<i>MEG3</i>	(Ying, L., et al., 2013)
	<i>HOTAIR</i>	(Yoon, J.H., et al., 2013)
Afectar en la comunicación intercelular	<i>linc-RoR</i>	(Takahashi, K., et al., 2014)

El lncRNA *ANRIL* (*Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus*), también conocido como *CDKN2B-AS1*, regula la expresión de *CDKN2A* y *CDKN2B* (Kotake, Y., et al., 2011). Tanto *ANRIL* como los genes que regula, se encuentran en la región 9p21 (**Figura 2b**), región que ya ha sido relacionada con diversas patologías asociadas a la edad, como es el caso de las enfermedades cardiovasculares (Broadbent, H.M., et al., 2008), la diabetes de tipo 2 (Broadbent, H.M., et al., 2008), cáncer (Turnbull, C., et al., 2010), Alzheimer (Emanuele, E., et al., 2011) o debilidad en pacientes de edad avanzada (Melzer, D., et al., 2007). Este hecho hace interesante el estudio del lncRNA *ANRIL* en relación con la edad.

ANRIL, lncRNA que consta de 126,304 kb, se transcribe en la dirección opuesta a los genes *CDKN2A* y *CDKN2B*. En total, contiene 19 exones; el primer exón se encuentra en el promotor del gen *CDKN2B* y el último exón contiene un sitio de poliadenilación (**Figura 2**).

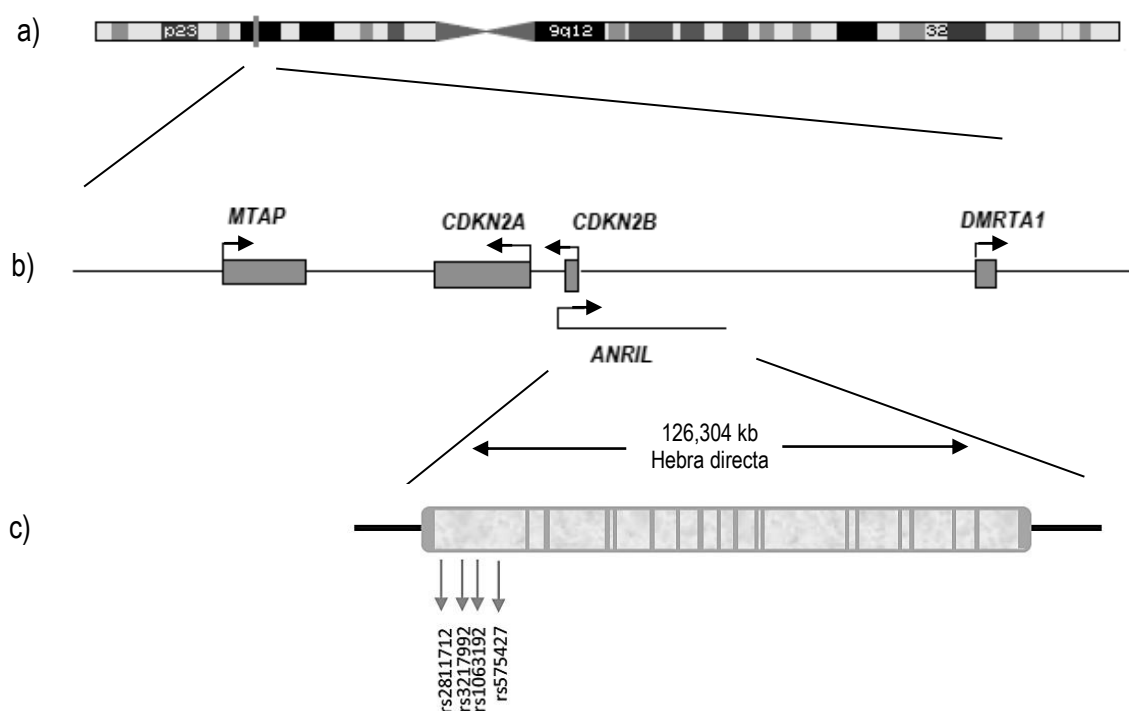


Figura 2. (a) Cromosoma 9 ; (b) región 9p21 ; (c) lncRNA *ANRIL*. Se muestra la posición de los tag-SNP estudiados en este trabajo, los cuales se encuentran en la región promotora de *ANRIL*, concretamente, en el primer intrón. Los 19 exones se ven representados por barras verticales. Información adquirida de *Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>).

Son varios los estudios de variantes genéticas que se han realizado en *ANRIL*. Por ejemplo, se ha demostrado que el tag-SNP rs2811712 está relacionado con una reducción de la discapacidad física en edad avanzada; en concreto, se observa una reducción del 50% de los casos de discapacidad severa en pacientes de 65-80 años, comparando los homocigotos para el alelo común (AA) y los homocigotos para el alelo menor (GG) (Melzer, D., et al., 2007).

En esta línea, hay estudios que demuestran que rs1333049 está asociado a la longevidad, en la población española (Pinos, T., et al., 2014) e italiana (Emanuele, E., et al., 2010). Este SNP se encuentra a 4410 bases corriente abajo de *ANRIL*, por lo que se cree que podría modular este proceso de envejecimiento. Además, este SNP está completamente asociado a la susceptibilidad frente a las enfermedades cardiovasculares, por lo que se cree que variantes genéticas que aportan protección frente a estos trastornos, los cuales son las causas de mortalidad más comunes, son más abundantes en individuos longevos (Congrains, A., et al., 2015).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, se plantea la **hipótesis** de que la desregulación de *ANRIL* podría estar implicada en la longevidad humana, considerando que esta desregulación puede ser debida a variantes genéticas en la región promotora. Por tanto, el **objetivo** de este trabajo fue determinar el efecto de las variantes genéticas en el promotor del lncRNA *ANRIL* en la población longeva.

Para ello, se presentan los siguientes objetivos específicos:

1. Selección de tag-SNPs que cubren la región promotora de *ANRIL*.
2. Determinación de los SNPs asociados a la longevidad, mediante un estudio de asociación “caso-control”.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente estudio incluyó un total de 315 muestras de sangre periférica recogidas entre los años 2004 y 2007, procedente de 199 individuos menores de 34 años y 116 mayores

de 90 años, todos ellos españoles. Todas las personas incluidas en el estudio aceptaron participar voluntariamente en el mismo, con previa información de la finalidad y tras firmar el correspondiente consentimiento informado. En los casos de los donantes menores de edad, el consentimiento fue autorizado y firmado por sus padres.

3.2. SELECCIÓN DE SNPs

Se seleccionaron un total de 4 polimorfismos de un solo nucleótido (“*Single Nucleotide Polymorphism*” – SNP –) en el lncRNA *ANRIL* (**Figura 2c**) en la región reguladora 5’UTR, todos ellos tagSNPs ($r^2 > 0,8$).

Para ello, se utilizó la base de datos del proyecto Internacional HapMap (versión #24; <http://www.hapmap.org>) y el software Haploview v4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (Broad Institute, Cambridge, USA). Todos los SNPs seleccionados tuvieron una frecuencia del alelo menor (MAF) mayor del 5% ($MAF \geq 0,05$) en poblaciones europeas y caucásicas (**Tabla 3**).

Tabla 3. Selección de SNPs.

SNP	Localización	Alelos *	Freq. (HapMap-CEU)
rs2811712	chr9: 21988035	G/A	0,071
rs3217992	chr9: 21993223	A/G	0,374
rs1063192	chr9: 21993367	C/T	0,451
rs575427	chr9: 22001477	C/T	0,106

* El alelo con menor frecuencia se encuentra en primera posición.

3.3. GENOTIPADO DE SNPs

El genotipado de los 4 tag-SNPs se realizó utilizando la tecnología GoldenGate de VeraCode, Illumina, en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen-ISCIH).

En primer lugar, la muestra de ADN se marca con Biotina o Estreptavidina (250ng de ADN a 50 ng/ μ L). Esta marca sirve para que, posteriormente, se le unan los cebadores específicos diseñados para cada SNP. En concreto, se diseñan 3 cebadores: dos de ellos son específicos para cada alelo del SNP (en inglés, “*Allele-Specific Oligo*”- ASO -); el tercero, el cual contiene un código que identifica cada SNP, hibrida unas bases corriente abajo del locus del SNP (en inglés, “*Locus-Specific Oligo*”- LSO -). El siguiente paso es

la extensión de los ASOs hacia la LSO y posteriormente, se amplifica esta región mediante una reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, “*Polymerase Chain Reaction*” – PCR –) con cebadores universales. Estos están marcados con diferentes sondas para cada ASO (Cy-3 y Cy-5). De esta manera, se puede identificar cada alelo del SNP. Estos productos se hibridan en una matriz, permitiendo el análisis de cada SNP mediante señal fluorescente (**Figura 3**).

El éxito de genotipado para cada SNP se calculó con el software Haploview (v 4.2).

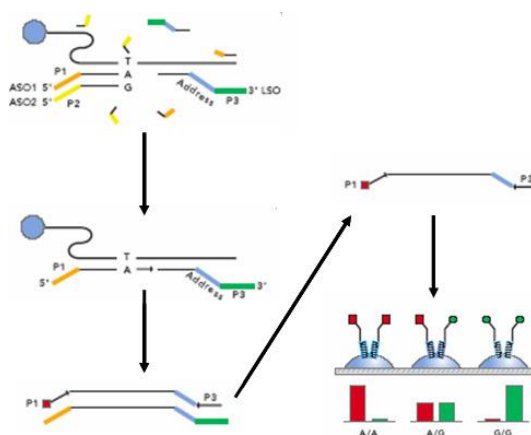


Figura 3. Resumen del ensayo GoldenGate® (<http://www.dkfz.de/gpcf/269.html>, 11/06/2015)

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizó el análisis de asociación, indicando los valores de “*Odds Ratio*” (OR) y los intervalos de confianza del 95 %. El concepto de OR representa el cociente entre el número de veces que ocurre el suceso frente a cuántas veces no ocurre. Así, un SNP con un valor de $OR > 1$ mostrará riesgo frente al fenotipo en cuestión, mientras que un valor de $OR < 1$ representará protección; el valor $OR = 1$ significa que existe la misma probabilidad de que aparezca o no dicho fenotipo, por lo cual es signo de un SNP no significativo. La comparación de frecuencias genotípicas entre ambas poblaciones se llevó a cabo mediante el modelo de regresión logística utilizando 4 modelos de herencia genéticos diferentes: codominante, dominante, recesivo y aditivo. En el caso de la comparación de frecuencias alélicas, se llevó a cabo mediante el test de χ^2 , tomando un nivel de significancia de 0,05. Los datos se procesaron utilizando la librería “SNPAssoc” para el software R (Versión de R 3.0.3, “*the R Foundation for Statistical Computing*”). Se evaluó el χ^2 para el equilibrio Hardy-Weinberg en la población de menores de 34 años.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA Y SNPs

De cada individuo se recogieron datos de edad y sexo, lo cual se refleja en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Características del estudio de población.

	Individuos < 34 años	Individuos > 90 años
Número, n	199 (63,17 %)	116 (36,83 %)
Edad (media)	20,78 ± 10,6	94 ± 3,08
Sexo, n (%)		
Femenino	86 (43,22 %)	85 (73,28 %)
Edad (media)	20,88 ± 10,53	94 ± 3,08
Masculino	113 (56,78 %)	31 (26,72 %)
Edad (media)	20,58 ± 10,55	93,84 ± 2,93

En este trabajo se ha analizado la variabilidad genética del promotor del lncRNA *ANRIL*, en concreto, se han genotipado los siguientes tag-SNPs: rs3217992, rs575427, rs1063192 y rs2811712. El desequilibrio de ligamiento de estos se muestra en la **Figura 4**.

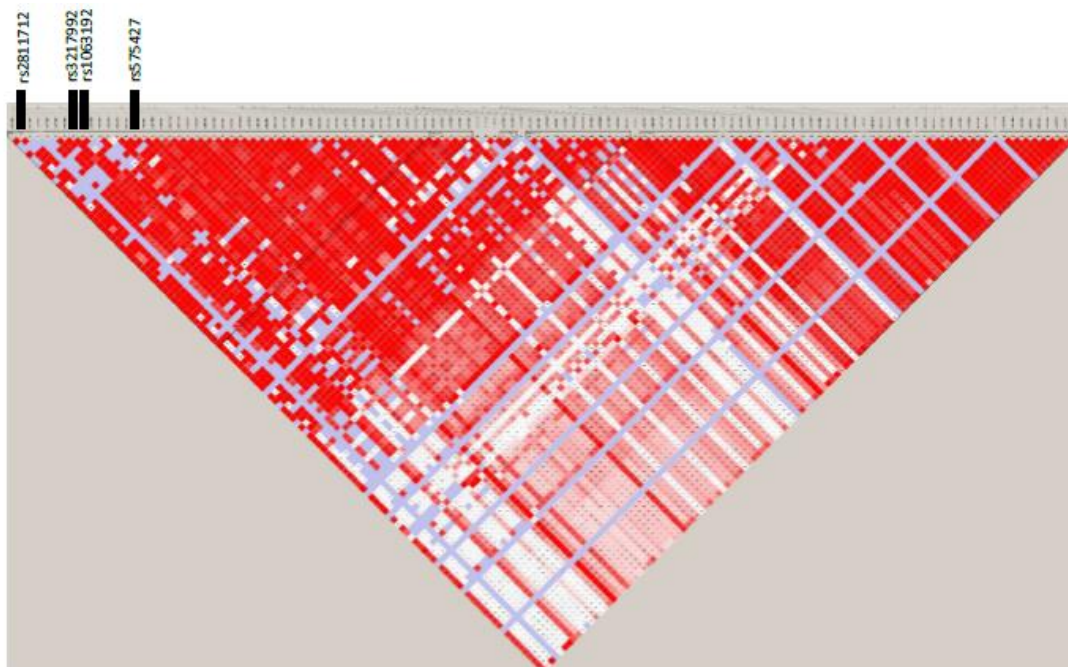


Figura 4. Diagrama de desequilibrio de ligamiento del lncRNA *ANRIL*, en Haploview. Los bloques han sido creados mediante un algoritmo (Gabriel, S.B., et al., 2002), basándose en el nivel de desequilibrio de ligamiento del 95 % de las comparaciones informativas. Se indican los tag-SNPs estudiados.

Como se puede apreciar, todos los tag-SNPs estudiados se encuentran en un mismo bloque, por lo que se heredarán de manera conjunta a las siguientes generaciones. Los 4 tag-SNPs dan información de un total de 33 SNPs ($r^2 > 0,8$) (**Tabla 5**).

Tabla 5. SNPs asociados en alto desequilibrio de ligamiento a los tag-SNPs estudiados ($r^2 > 0,8$)

tag-SNP	SNPs asociados			
rs2811712	rs17694555	rs2069422	rs1333035	rs2069426
	rs3218018	rs3218002	rs1333034	rs598664
	rs662463	rs17756311	rs3218005	rs17694572
rs575427	rs495490	rs1759417	rs12376000	
rs3217992	rs10738604	rs3218020	rs10811641	rs545226
rs1063192	rs634537	rs1333037	rs679038	rs1360589
	rs1412829	rs564398	rs1008878	rs573687
	rs2157719	rs1556515	rs944801	rs543830
	rs7030641	rs7865618		

El éxito de genotipado fue superior al 98,5% en los 4 tag-SNPs analizados. Las frecuencias genotípicas de la población control estaban en EHW ($p > 0,05$).

4.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS tag-SNPs Y LONGEVIDAD

El análisis de asociación entre los genotipos de los tag-SNPs rs2811712, rs575427, rs3217992 y rs1063192 y la longevidad no mostró ningún resultado significativo ($p > 0,05$) (**Tabla 6**), es decir, no existen diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas de las poblaciones de individuos menores de 34 años y mayores de 90. Atendiendo a los valores obtenidos ajustados por sexo (**Tabla 7**), se observa que el valor de p para el tag-SNP rs3217992 es menor que 0,05 para el modelo de herencia codominante ($p = 0,04638$); sin embargo, no puede ser considerado significativo, ya que el intervalo de confianza del OR incluye el valor 1, reflejando un mismo efecto del genotipo en ambas poblaciones.

Tabla 6. Resultados del análisis estadístico de genotipos para los SNPs seleccionados. Ind, individuos.

SNP	Genotipo	N (%) ind. <34	N (%) ind. >90	Modelo codominante		Modelo dominante		Modelo recesivo		Modelo aditivo	
				OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
rs3217992	GG	53 (26,9)	36 (31,3)	1,00	0,11742	1,00	0,40796	1,00	0,13292	1,06 (0,76 1,47)	0,72504
	AG	107 (54,3)	49 (42,6)	0,67 (0,39 1,16)		0,81 (0,49 1,34)		1,00			
	AA	37 (18,8)	30 (26,1)	1,19 (0,63 2,27)		0,81 (0,49 1,34)		1,53 (0,88 2,64)			
rs575427	TT	158 (79,4)	90 (77,6)	1,00	0,7771	1,00	0,7056	1,00	0,6115	1,06 (0,64 1,76)	0,8238
	CT	38 (19,1)	25 (21,6)	1,15 (0,65 2,04)		1,11 (0,64 1,94)		1,00			
	CC	3 (1,5)	1 (0,9)	0,59 (0,06 5,71)		1,11 (0,64 1,94)		0,57 (0,06 5,53)			
rs1063192	TT	76 (38,8)	42 (36,5)	1,00	0,9208	1,00	0,6922	1,00	0,8377	1,07 (0,76 1,52)	0,6955
	CT	96 (49,0)	58 (50,4)	1,09 (0,66 1,80)		1,10 (0,68 1,77)		1,00			
	CC	24 (12,2)	15 (13,0)	1,13 (0,54 2,39)		1,10 (0,68 1,77)		1,07 (0,54 2,14)			
rs2811712	AA	161 (80,9)	89 (77,4)	1,00	0,7598	1,00	0,4589	1,00	0,8752	1,20 (0,73 1,98)	0,4810
	GA	35 (17,6)	24 (20,9)	1,24 (0,69 2,22)		1,24 (0,71 2,17)		1,00			
	GG	3 (1,5)	2 (1,7)	1,21 (0,20 7,35)		1,24 (0,71 2,17)		1,16 (0,19 7,02)			

Tabla 7. Resultados ajustados por sexo del análisis estadístico de genotipos para los SNPs seleccionados. Ind, individuos. Aj, ajustado por sexo.

SNP	Genotipo	N (%) ind. <34	N (%) ind. >90	Modelo codominante		Modelo dominante		Modelo recesivo		Modelo aditivo	
				OR (IC 95%)	p. Aj.	OR (IC 95%)	p. Aj.	OR (IC 95%)	p. Aj.	OR (IC 95%)	p. Aj.
rs3217992	GG	53 (26,9)	36 (31,3)	1,00	0,04638	1,00	0,39597	1,00	0,05680	1,10 (0,78 1,56)	0,57087
	AG	107 (54,3)	49 (42,6)	0,63 (0,36 1,11)		0,79 (0,47 1,35)		1,00			
	AA	37 (18,8)	30 (26,1)	1,32 (0,67 2,61)		0,79 (0,47 1,35)		1,76 (0,98 3,16)			
rs575427	TT	158 (79,4)	90 (77,6)	1,00	0,5088	1,00	0,4949	1,00	0,4456	1,12 (0,66 1,91)	0,6688
	CT	38 (19,1)	25 (21,6)	1,31 (0,72 2,38)		1,23 (0,68 2,20)		1,00			
	CC	3 (1,5)	1 (0,9)	0,45 (0,04 4,57)		1,23 (0,68 2,20)		0,42 (0,04 4,33)			
rs1063192	TT	76 (38,8)	42 (36,5)	1,00	0,7788	1,00	0,9438	1,00	0,5152	1,05 (0,73 1,52)	0,7850
	CT	96 (49,0)	58 (50,4)	0,93 (0,55 1,57)		0,98 (0,60 1,62)		1,00			
	CC	24 (12,2)	15 (13,0)	1,22 (0,56 2,69)		0,98 (0,60 1,62)		1,28 (0,62 2,64)			
rs2811712	AA	161 (80,9)	89 (77,4)	1,00	0,8818	1,00	0,6171	1,00	0,9312	1,13 (0,67 1,92)	0,6381
	GA	35 (17,6)	24 (20,9)	1,17 (0,63 2,14)		1,16 (0,65 2,09)		1,00			
	GG	3 (1,5)	2 (1,7)	1,12 (0,17 7,42)		1,16 (0,65 2,09)		1,09 (0,16 7,18)			

Analizando las frecuencias alélicas (**Tabla 8**), se puede observar que tampoco se ha obtenido ningún valor significativo, reflejando que no hay una diferencia relevante en la frecuencia de los alelos de cada tag-SNP estudiado comparando la población de menores de 34 años y la población de mayores de 90.

Tabla 8. Frecuencias de los alelos en las poblaciones de controles y casos.

SNP	Alelo	Individuos <34 años		Individuos >90 años		OR (IC 95%)	p
		nº	Frecuencia	nº	Frecuencia		
rs3217992	A	181	0,4594	109	0,4739	1,060 (0,755 1,488)	0,7399
rs575427	C	44	0,1105	27	0,1164	1,059 (0,611 1,810)	0,8962
rs1063192	C	144	0,3673	88	0,3826	1,067 (0,751 1,513)	0,7315
rs2811712	G	41	0,1030	28	0,1217	1,206 (0,696 2,067)	0,5085

5. DISCUSIÓN

El incremento de la edad en la población es un hecho en países desarrollados, lo cual se sabe que es debido en parte a factores genéticos. Se han realizado estudios que lo demuestran, la mayor parte de ellas centradas en genes codificantes (Kolovou, G.D., et al., 2014). Sin embargo, cada vez son más los estudios realizados en regiones no codificantes.

El lncRNA *ANRIL* se encuentra en la región 9p21, la cual es una de las dianas más importantes en los estudios relacionados con el proceso de envejecimiento. En este trabajo, se ha realizado el estudio de asociación de los tag-SNPs rs3217992, rs575427, rs1063192 y rs2811712 localizados en la región promotora de *ANRIL*. No se ha obtenido ningún resultado significativo para ninguno de los tag-SNPs analizados, ni en genotipos ni en alelos, es decir, no se aprecian diferencias relevantes entre la población de individuos menores de 34 años y la población de mayores de 90.

Existen estudios en los que se demuestra que la expresión del lncRNA *ANRIL* está inversamente correlacionado con la expresión de los genes codificantes de supresores de tumores *CDKN2A* y *CDKN2B*; la sub-expresión de *ANRIL* hace que las células entren en el proceso de senescencia y por tanto, envejecan (Kotake, Y., et al., 2011). Aunque se sabe que polimorfismos en la región promotora pueden afectar en la expresión de un gen

(Wu, H., et al., 2014), los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que variantes genéticas en la región promotora de *ANRIL* no son responsables de la desregulación en su expresión.

Durante la realización del trabajo presente, Congrains, A., et al. (2015) publicaron un estudio en el que se analizan 15 tag-SNPs de la región 9p21, de los cuales 10 se encuentran en el lncRNA *ANRIL*. En este caso, emplearon dos poblaciones control (individuos menores de 50 años y septuagenarios) y una población de casos formada por centenarios, todos ellos pertenecientes de la población japonesa. Dentro de los tag-SNPs estudiados en esta publicación, los SNPs rs3218020, rs2811712 y rs564398 se incluyen en el trabajo presente. Al igual que en nuestro caso, tampoco se obtuvo ningún resultado significativo para ninguno de ellos en relación a la longevidad, por lo que este estudio confirmaría nuestros resultados.

6. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que variantes genéticas en la región promotora del lncRNA *ANRIL* no contribuyen a la longevidad. Sería de gran interés analizar otras variantes genéticas en otros lncRNAs que se hayan visto desregulados en el proceso de envejecimiento y longevidad, como es el caso de *MALATI*, *TERRA* o *HOTAIR*, entre otros.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelmohsen, K., Panda, A., Kang, M.J., Xu, J., Selimyan, R., Yoon, J.H., Martindale, J.L., De, S., Wood, W.H., Becker, K.G., et al. 2013. Senescence-associated lncRNAs: Senescence-associated long noncoding RNAs. *Aging Cell*. 12(5):890-900.
- Broadbent, H.M., Peden, J.F., Lorkowski, S., Goel, A., Ongen, H., Green, F., Clarke, R., Collins, R., Franzosi, M.G., Tognoni, G., et al. 2008. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the *ANRIL* locus on chromosome 9p. *Hum. Mol. Genet*. 17(6):806-814.
- Congrains, A., Kamide, K., Hirose, N., Arai, Y., Oguro, R., Nakama, C., Imaizumi, Y., Kawai, T., Kusunoki, H., Yamamoto, H. 2015. Disease-associated polymorphisms in 9p21 are not associated with extreme longevity. *Geriatr. Gerontol. Int*. 15(6):797-803
- Emanuele, E., Fontana, J.M., Minoretti, P., Geroldi, D. 2010. Preliminary evidence of a genetic association between chromosome 9p21.3 and human longevity. *Rejuvenation Res*. 13(1):23-26.

- Emanuele, E., Lista, S., Ghidoni, R., Binetti, G., Cereda, C., Benussi, L., Maletta, R., Bruni, A.C., Politi, P. 2011. Chromosome 9p21.3 genotype is associated with vascular dementia and alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 32(7):1231-1235.
- Esteller, M. 2011. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 12(12):861-874.
- Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., et al. 2002. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 296(5576):2225-2229.
- Iachine, I., Skytthe, A., Vaupel, J.W., McGue, M., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Pedersen, N.L., Christensen, K. 2006. Genetic influence on human lifespan and longevity. *Hum. Genet.* 119(3):312-321.
- Kim, S., Bi, X., Czarny-Ratajczak, M., Dai, J., Welsh, D.A., Myers, L., Welsch, M.A., Cherry, K.E., Arnold, J., Poon, L.W., et al. 2012. Telomere maintenance genes SIRT1 and XRCC6 impact age-related decline in telomere length but only SIRT1 is associated with human longevity. *Biogerontology*. 13(2):119-131.
- Kleindorp, R., Flachsbart, F., Puca, A.A., Malovini, A., Schreiber, S., Nebel, A. 2011. Candidate gene study of FOXO1, FOXO4, and FOXO6 reveals no association with human longevity in germans. *Aging Cell*. 10(4):622-628.
- Kolovou, G., Kolovou, V., Vasiliadis, I., Giannakopoulou, V., Mihas, C., Bilianou, H., Kollia, A., Papadopoulou, E., Marvaki, A., Goumas, G., et al. 2014. The frequency of 4 common gene polymorphisms in nonagenarians, centenarians, and average life span individuals. *Angiology*. 65(3):210-215.
- Kolovou, G.D., Kolovou, V., Mavrogeni, S. 2014. We are ageing. *Biomed. Res. Int.* 2014: 808307.
- Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M., Xiong, Y. 2011. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene*. 30(16):1956-1962.
- Loewer, S., Cabili, M.N., Guttman, M., Loh, Y.H., Thomas, K., Park, I.H., Garber, M., Curran, M., Onder, T., Agarwal, S., et al. 2010. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Genet.* 42(12):1113-1117.
- Melzer, D., Frayling, T.M., Murray, A., Hurst, A.J., Harries, L.W., Song, H., Khaw, K., Luben, R., Surtees, P.G., Bandinelli, S.S. 2007. A common variant of the p16 INK4a genetic region is associated with physical function in older people. *Mech. Ageing. Dev.* 128(5):370-377.
- Melzer, D. 2008. Genetic polymorphisms and human aging: Association studies deliver. *Rejuvenation Res.* 11(2):523-526.
- Pinos, T., Fuku, N., Camara, Y., Arai, Y., Abe, Y., Rodriguez-Romo, G., Garatachea, N., Santos-Lozano, A., Miro-Casas, E., Ruiz-Meana, M., et al. 2014. The rs1333049 polymorphism on locus 9p21.3 and extreme longevity in spanish and japanese cohorts. *Age (Dordr)* 36(2):933-943.
- Porro, A., Feuerhahn, S., Lingner, J. 2014. TERRA-reinforced association of LSD1 with MRE11 promotes processing of uncapped telomeres. *Cell Rep.* 6(4):765-776.

- Qureshi, I.A., Mehler, M.F. 2013. Long non-coding RNAs: Novel targets for nervous system disease diagnosis and therapy. *Neurotherapeutics*. 10(4):632-646.
- Samper, E., Flores, J.M., Blasco, M.A. 2001. Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *terc*^{-/-} mice with short telomeres. *EMBO Rep*. 2(9):800-807.
- Sana, J., Faltejiskova, P., Svoboda, M., Slaby, O. 2012. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J. Transl. Med.* 10:103,5876-10-103.
- Schupf, N., Barral, S., Perls, T., Newman, A., Christensen, K., Thyagarajan, B., Province, M., Rossi, W.K., Mayeux, R. 2013. Apolipoprotein E and familial longevity. *Neurobiol. Aging*. 34(4):1287-1291.
- Soerensen, M., Dato, S., Tan, Q., Thinggaard, M., Kleindorp, R., Beekman, M., Jacobsen, R., Suchiman, H.E., de Craen, A.J., Westendorp, R.G., et al. 2012. Human longevity and variation in GH/IGF-1/insulin signaling, DNA damage signaling and repair and pro/antioxidant pathway genes: Cross sectional and longitudinal studies. *Exp. Gerontol*. 47(5):379-387.
- Takahashi, K., Yan, I.K., Kogure, T., Haga, H., Patel, T. 2014. Extracellular vesicle-mediated transfer of long non-coding RNA ROR modulates chemosensitivity in human hepatocellular cancer. *FEBS Open Bio*. 4:458-467.
- Tripathi, V., Shen, Z., Chakraborty, A., Giri, S., Freier, S.M., Wu, X., Zhang, Y., Gorospe, M., Prasanth, S.G., Lal, A., et al. 2013. Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. *PLoS Genet*. 9(3):e1003368.
- Turnbull, C., Ahmed, S., Morrison, J., Pernet, D., Renwick, A., Maranian, M., Seal, S., Ghousaini, M., Hines, S., Healey, C.S., et al. 2010. Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nat. Genet*. 42(6):504-507.
- Weinert, B.T., Timiras, P.S. 2003. Invited review: Theories of aging. *J. Appl. Physiol.* (1985) 95(4):1706-1716.
- Wu, H., Zhang, K., Gong, P., Qiao, F., Wang, L., Cui, H., Sui, X., Gao, J., Fan, H. 2014. A novel functional TagSNP Rs7560488 in the DNMT3A1 promoter is associated with susceptibility to gastric cancer by modulating promoter activity. *PLoS One*. 9(3):e92911.
- Yap, K.L., Li, S., Munoz-Cabello, A.M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M.J., Zhou, M.M. 2010. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol. Cell*. 38(5):662-674.
- Ying, L., Huang, Y., Chen, H., Wang, Y., Xia, L., Chen, Y., Liu, Y., Qiu, F. 2013. Downregulated MEG3 activates autophagy and increases cell proliferation in bladder cancer. *Mol. Biosyst*. 9(3):407-411.
- Yoon, J.H., Abdelmohsen, K., Kim, J., Yang, X., Martindale, J.L., Tominaga-Yamanaka, K., White, E.J., Orjalo, A.V., Rinn, J.L., Kreft, S.G., et al. 2013. Scaffold function of long non-coding RNA HOTAIR in protein ubiquitination. *Nat. Commun*. 4:2939.