



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“IMPACTO DEL METILOMA EN LA COGNICIÓN, ENVEJECIMIENTO Y RESPUESTA FARMACOLÓGICA EN PACIENTES CON TRASTORNOS PSICÓTICOS PRIMARIOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

BLANCA ESTELA PÉREZ ALDANA

COMITÉ TUTORAL

Dra. Marisol López López (Codirectora)

Dra. Nancy Monroy Jaramillo (Codirectora)

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís (Asesor)

Ciudad de México, 25 de septiembre de 2024

Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética Molecular N-103 del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco y en el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, bajo la dirección de la Dra. Marisol López López del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco y de la Dra. Nancy Monroy Jaramillo del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo del Dr. Ernesto Soto Reyes Solís de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa.

La autora agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 766012, que comprendió del periodo de 1 de enero del 2020 al 31 de diciembre del 2023. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados del CONAHCYT, con número de referencia 001480.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

Blanca Estela Pérez Aldana

El día 25 de septiembre de 2024

JURADO:



Presidenta: Dra. Marisol López López



Secretaria: Dra. Nancy Monroy Jaramillo



Vocal: Dr. Ernesto Soto Reyes-Solís



Vocal: Dr. Miguel Ángel Ramírez García



Vocal: Dra. Lizbeth Esmeralda García Velázquez

*“Pocas veces he sentido emoción más intensa que cuando creí haber
hecho descubrimientos de alguna trascendencia”*

Severo Ochoa

Dedico esta tesis a Carlos, mamá: Eloisa y hermanas: Areli, Lizeth y Lizbeth. Gracias por el enorme apoyo para poder culminar con éxito esta etapa.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al CONAHCyT por haber proporcionado la beca de manutención para mis estudios de doctorado

A la UAM-Xochimilco por haberme permitido formar parte de esta grandiosa comunidad, por haberme provisto de recursos económicos e infraestructura para la realización de mis estudios.

A la UAM-Cuajimalpa por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar experimentos que me permitieran incrementar mis conocimientos.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez por permitirme obtener las muestras de pacientes que participaron e hicieron posible la presente investigación.

Al programa del Doctorado en Ciencias biológicas y de la Salud por permitirme formar parte de su matrícula, sin duda una oportunidad que me ha dejado muchas enseñanzas.

A mi Comité tutorial por todos los conocimientos compartidos:

Dra. Marisol por permitirme formar parte de su equipo, por los conocimientos compartidos no sólo para la realización de la presente investigación, sino también para mi vida profesional.

Dra. Nancy por todo lo que enseñó, por contagiarme el amor y entusiasmo por la investigación, por enseñarme que a pesar de las adversidades el camino de la investigación tiene siempre grandes recompensas.

Dr. Ernesto por compartir su amplio conocimiento conmigo, por compartirme su energía y optimismo cuando parecía que las cosas no saldrían bien.

Al Jurado:

Dra. Lizbeth por los comentarios al presente trabajo, por el apoyo, por conducirme a un análisis más profundo, por cuestionarme para mejorar siempre los resultados.

Dr. Miguel Ángel porque cada comentario me hizo mejor el presente trabajo y por motivarme a ser más observadora en los detalles.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Carlos por ser mi apoyo, por darme ánimo para seguir siempre, por creer en mí, por alegrarte con mis alegrías y abrazarme en mis fracasos, por motivarme en todo momento y por soportar todos mis momentos de estrés infinito, por caminar conmigo este camino, aunque no siempre fui la mejor compañía.

Mamita por creer en mí siempre, por enseñarme que cuando trabajamos con disciplina y perseverancia logramos grandes cosas.

Are por tu confianza, tu apoyo, por contagiarme la alegría y entusiasmo por la vida y por mostrarme que por más duro que sean los golpes, siempre podemos salir adelante y lograr

Liz por estar siempre para mí, por hacerme reír cuando más lo necesitaba, por mostrarme que podemos vivir con una sonrisa a pesar de todo.

Beti por enseñarme que la disciplina, la constancia, la dedicación nos hacen conseguir nuestras metas.

Mis niñas y niños hermos@s Xime, Itze, Sofi, Jesús, por confiar siempre en mí, por creer que puedo lograrlo todo, por contagiarme de alegría e inocencia en los momentos en que creí y no podía y sobre todo por el inmenso cariño que me han mostrado siempre, el ingrediente secreto de todo mi trabajo.

Familia, todos porque siempre han confiado en mí y me han brindado su apoyo, Madrina Berti, Padrino, Dianis, Dani, Rodri, Marina, Ali, Nancy, Juanita, Richi, Luis... todos.

Alberto por la confianza, por contagiarme el amor por la investigación, la docencia, la ciencia en si, por acompañarme en este grandioso, pero a veces difícil camino y por apoyarme siempre que lo necesité.

Compañeros del laboratorio de Genética molecular Salvador, Karencita, Ali, Jesús y todos los chicos que cada día me brindaron su apoyo, consejo y palabras de aliento, por hacerme más alegres y amenas las horas de laboratorio, por echarme porras cuando los experimentos no salían y por celebrar conmigo cuando salía todo bien.

UAMigos: Esau, Anita, Cit, Migue, Jetsa y Lore que a pesar la distancia y las ocupaciones siempre me brindaron palabras de aliento para poder llegar hasta aquí,

Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud

Aranza mi amiga de toda la vida, porque siempre confiaste en que lo lograría, porque siempre me apoyaste, siempre me diste palabras de aliento y siempre has festejado conmigo cada logro.

Papá porque de manera tal vez de manera inconsciente, pero me impulsaste a llegar aquí...



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Declaración de originalidad

La que Blanca Estela Pérez Aldana, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, y autora de la tesis o titulada: **Impacto del metiloma en la cognición, envejecimiento y respuesta farmacológica en pacientes con trastornos psicóticos primarios**",

Declaro que:

1. La tesis que presento ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para lo obtención del grado de Doctora es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y/o fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 25 de septiembre del 2024.

Atentamente

Blanca Estela Pérez Aldana

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

doctoradocbs@correo.uam.mx

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

<http://posgradocbs.uam.mx>

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, el día 25 de septiembre del año 2024, quien suscribe Blanca Estela Pérez Aldana, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es autora intelectual de la tesis titulada **“Impacto del metiloma en la cognición, envejecimiento y respuesta farmacológica en pacientes con trastornos psicóticos primarios”**, bajo la dirección del Comité Tutoral conformado por la Dra. Marisol López López, la Dra. Nancy Monroy Jaramillo y del Dr. Ernesto soto Reyes-Solís, cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso de la autora o del Comité Tutoral del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico blanca.perezaldana@gmail.com; si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Blanca Estela Pérez Aldana
Matrícula: 2193802436



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

doctoradocbs@correo.uam.mx

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

<http://posgradocbs.uam.mx>

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Trastornos psicóticos.....	2
2.1.1 La esquizofrenia.....	3
2.1.2 El trastorno bipolar.....	4
2.1.3 El trastorno esquizoafectivo.....	5
2.1.4 El tratamiento de trastornos psicóticos.....	5
2.2 El envejecimiento biológico.....	6
2.3 Los marcadores de envejecimiento biológico.....	6
2.3.1 La metilación del DNA.....	7
2.3.2 La longitud telomérica.....	8
2.3.3 El número de copias del DNA mitocondrial.....	10
2.4 El deterioro cognitivo en los trastornos psicóticos.....	11
3. JUATIFICACIÓN.....	12
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	12
5. HIPÓTESIS.....	12
6. OBJETIVOS.....	12
6.1 Objetivo general.....	12
6.2 Objetivos específicos.....	12
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
7.1 Diseño del estudio.....	13
7.2 Población de estudio.....	13
7.2.1 Pacientes.....	12
7.2.1.1 Criterios de inclusión.....	13
7.2.1.2 Criterios de exclusión.....	14
7.2.2 Controles.....	14
7.2.2.1 Criterios de inclusión.....	14
7.2.2.2 Criterios de exclusión.....	14
7.2.3 Consideraciones éticas.....	14
7.3 Métodos.....	15
7.3.1 Toma de muestra.....	15

7.3.2	Extracción de DNA.....	15
7.3.3	Generación de la base de datos de pacientes y controles.....	15
7.3.4	Determinación de patrones de metilación global.....	16
7.3.5	Análisis de sitios con metilación diferencial.....	17
7.3.6	El cálculo de la edad epigenética.....	17
7.3.7	El enriquecimiento de vías e interacciones proteína-proteína.....	18
7.3.8	La validación de la metilación diferencial por PCR específica de metilación (MS-PCR).....	18
7.3.9	Estandarización de la MS-PCR.....	19
7.3.10	La cuantificación relativa de la longitud telomérica y el número de copias de DNA mitocondrial.....	19
7.3.11	La evaluación de la respuesta a clozapina.....	20
8.	RESULTADOS.....	20
8.1	Características clínicas de los sujetos incluidos en el estudio.....	20
8.2	Localización de los sitios diferencialmente metilados con respecto al gen y a la isla CpG.....	24
8.3	Genes involucrados en los sitios con metilación diferencial.....	26
8.4	Regiones diferencialmente metiladas.....	27
8.5	La edad epigenética de las muestras analizadas.....	32
8.6	Comparación de la diferencia de la edad o Δ edad en pacientes maduros y jóvenes tratados con CLZ.....	39
8.7	Interacciones proteína-proteína.....	40
8.8	Validación de la metilación identificada por microarreglos.....	41
8.9	La longitud telomérica.....	44
8.10	Número de copias de DNA mitocondrial.....	45
9.	DISCUSIÓN.....	46
10.	CONCLUSIONES.....	49
11.	PERSPECTIVAS.....	49
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
	ANEXO I. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PACIENTES TRATADOS CON CLZ. PROYECTO: MARCADORES DE ENVEJECIMIENTO EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS Y PSIQUIÁTRICAS.	
	ANEXO II. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PACIENTES TRATADOS CON CLZ. PROYECTO: IMPACTO DE LA VARIABILIDAD	

GENÉTICA INTERINDIVIDUAL EN LA FARMACOCINÉTICA DE CLOZAPINA Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA CLÍNICA EN PACIENTES CON ESPECTRO ESQUIZOAFECTIVO.

ANEXO III. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS SUJETOS CONTROL PROYECTO INNNMVS.

ANEXO IV. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS SUJETOS CONTROL PROYECTO UAM XOCHIMILCO.

ANEXO V. PUBLICACIÓN: LONG-TERM TREATMENT WITH CLOZAPINE MIGHT REDUCE EPIGENETIC AGE PRESUMABLY BY HYPOMETHYLATION OF LONGEVITY REGULATORY PATHWAYS GENES.

ANEXO VI. CONSTANCIAS DE PRESENTACIONES EN CONGRESOS DERIVADOS DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS.

ÍNDICE DE TABLAS

Número de tabla	Nombre de la tabla	Página
Tabla 1	Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con CLZ (n=31) analizados para metiloma.	21
Tabla 2	Características clínicas y demográficas de pacientes con trastornos psiquiátricos sin tratamiento psicofarmacológico/psicotrópico (n=56) analizados para metiloma.	22
Tabla 3	Características clínicas del grupo de pacientes con trastornos psicóticos tratados con CLZ (n=58) para análisis de la LT y el mtDNA-CN.	23
Tabla 4	Características del grupo control (n=58).	24
Tabla 5	Enriquecimiento de vías de los sitios hipometilados con metilación diferencial.	29
Tabla 6	Enriquecimiento de vías de los sitios hipermetilados con metilación diferencial.	31
Tabla 7	Secuencias de oligonucleótidos para validación de metilación diferencial, por MS-PCR.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	Nombre de la figura	Página
Figura 1	Representación gráfica de islas CpG.	8
Figura 2	Representación gráfica de la disminución de la longitud telomérica con el paso del tiempo.	9
Figura 3	Diagrama de flujo sobre el número de sujetos incluidos en el estudio.	21
Figura 4	Número de sitios con metilación diferencial y su distribución respecto a un gen y a una isla CpG.	25
Figura 5	Gráfico de volcán que muestra las rutas enriquecidas de los genes ubicados dentro de las regiones metiladas diferencialmente.	28
Figura 6	Dispersión de la edad cronológica y su correlación con la edad epigenética.	33
Figura 7	Gráficos de violín de la Δ edad de pacientes tratados con CLZ y sin tratamiento psicofarmacológico previo.	34
Figura 8	Gráficos de violín para Δ edad por género entre pacientes tratados con CLZ y pacientes sin tratamiento psicofarmacológico previo.	37
Figura 9	Diagrama de cajas para la comparación de la Δ edad de los pacientes de acuerdo con la edad cronológica y el periodo de tratamiento con CLZ.	39
Figura 10	Gráfico de interacciones proteína-proteína entre los productos génicos de la vía reguladora de la longevidad.	40
Figura 11	Gráfica de las condiciones de amplificación de MS-PCR.	42
Figura 12	Resultado de los cambios en la reacción de MS-PCR para <i>MICA</i> .	43
Figura 13	MS-PCR de los genes A) <i>MAPK4</i> y B) <i>FOXO3</i> .	44
Figura 14	Comparación de las medias de la cuantificación relativa de la LT entre pacientes y controles.	45
Figura 15	Comparación de la cuantificación relativa de la mtDNA-CN entre pacientes con TPP tratados con <i>CLZ</i> vs. controles sanos.	45
Figura 16	Correlación entre la LT y el mtDNA-CN en pacientes con TPP y controles sanos.	46

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CCI	Carta de consentimiento informado
CIE	Clasificación Internacional de Enfermedades
CLZ	Clozapina
CT	Controles
Ct	Ciclo umbral de la qPCR
DE	Desviación estándar
DMP	<i>Differentially Methylated Position</i> (sitios diferencialmente metilados)
DMR	<i>Differentially Methylated Regions</i> (regiones diferencialmente metiladas)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNA_m	Metilación de DNA
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> (Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales)
ESQ	Esquizofrenia
FUMA	<i>Functional Mapping and Annotation of Genome-Wide Association Studies</i> (Mapeo funcional y anotación de estudios de asociación de todo el genoma)
GWAS	<i>Genome wide association</i> (Estudio de asociación de genoma completo)
IMC	Índice de masa corporal
LT	Longitud telomérica
LTL	Longitud telomérica leucocitaria
mg	Miligramos
Min	Minutos
MM	Mestizo mexicano
M.Sss1	CpG metiltransferasa
MS-PCR	<i>Methylation-specific Polymerase Chain Reaction</i> (PCR específica de metilación)
mtDNA	DNA mitocondrial (Ácido desoxirribonucleico mitocondrial)
mtDNA-CN	Número de copias del DNA mitocondrial
n	Número de sujetos
OMS	Organización Mundial de la Salud

Px	Pacientes
qPCR	Quantitative PCR (PCR cuantitativa)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
SAM	S-adenosil-L-metionina
Seg	segundos
SNV	<i>Single nucleotide variant</i> (Variantes de un solo nucleótido)
TB	Trastorno bipolar
TEE	Trastorno esquizoafectivo
Tm	Temperatura de alineamiento
TPP	Trastornos psicóticos primarios
TPS	Trastornos psicóticos secundarios
TSS	<i>Transcription start sites</i> (Sitios de inicio de transcripción)
UTR	<i>Untranslated región</i> (Región no traducida)

RESUMEN

Los trastornos psicóticos primarios (TPP) son patologías mentales graves que se caracterizan por anomalías en el pensamiento, la percepción del entorno, las emociones, el lenguaje, la autopercepción y la conducta del paciente. Las psicosis suelen presentarse mediante alucinaciones y delirios. Además de otras manifestaciones clínicas como pensamiento y movimientos desorganizados y/o síntomas negativos.

Existen diversas causas de los TTP y, además, estos trastornos se caracterizan por un envejecimiento acelerado, lo que indica procesos de envejecimiento biológico más rápidos tras el inicio de la enfermedad. Los marcadores de envejecimiento acelerado en la psicosis abarcan diferentes sistemas biológicos e incluyen una longitud de telómero más corta, marcadores inflamatorios aumentados y deterioro funcional en el contexto del deterioro cognitivo.

Dentro de las opciones de tratamiento para los TPP se encuentra la clozapina (CLZ), que habitualmente prescrita cuando los pacientes se muestran resistentes al tratamiento antipsicótico. La CLZ es un antipsicótico atípico que ha demostrado mayor eficacia que el resto de antipsicóticos de primera y segunda generación, muestra mayor eficacia en el tratamiento de los síntomas de los TPP y es el único medicamento indicado para el tratamiento de la esquizofrenia (ESQ) refractaria o farmacorresistente.

El objetivo de este proyecto fue investigar la relación entre el metiloma, el deterioro cognitivo, el envejecimiento prematuro y la respuesta farmacológica a CLZ en pacientes con trastornos psicóticos primarios.

Se realizaron análisis de la edad epigenética, determinando la longitud telomérica (LT) y el número de copias del DNA mitocondrial (mtDNA-CN). Esto se logró comparando pacientes bajo tratamiento con CLZ y pacientes sin tratamiento psicofarmacológico previo. Así mismo, se realizaron comparaciones de la LT y el mtDNA-CN entre los pacientes bajo tratamiento con CLZ y sujetos controles clínicamente sanos.

De manera general se encontró que los pacientes tratados con CLZ tuvieron una edad epigenética (Δ edad) menor que los pacientes sin tratamiento psicofarmacológico. Además, se observaron diferencias entre pacientes añosos y jóvenes de acuerdo con el periodo de tratamiento. Aunado a esto, se encontró una de las vías de la longevidad en el análisis de

enriquecimiento de vías biológicas realizado con los genes que tuvieron metilación diferencial en el microarreglo.

Por otro lado, se encontró que los pacientes tratados con CLZ tuvieron una LT mayor que los sujetos control. Además, el mtDNA-CN fue igualmente mayor en pacientes bajo tratamiento con CLZ vs sujetos control.

En conclusión, los resultados obtenidos en relación con la metilación del DNA, la LT y el mtDNA-CN, sugieren que el tratamiento a largo plazo con CLZ podría tener cierto efecto geroprotector en pacientes con trastornos psicóticos primarios.

Palabras clave: Clozapina, envejecimiento, metiloma, telómeros, DNA mitocondrial.

ABSTRACT

Primary psychotic disorders (PPD) are serious mental illnesses that are characterized by abnormalities in thinking, perception, emotions, language, self-perception, and behavior. Psychoses usually present through hallucinations and delusions, along with other clinical manifestations such as disorganized thoughts and movements and/or negative symptoms.

There are various causes of PPD, and these disorders are also characterized by accelerated biological aging, which indicates faster aging processes after the onset of the disease. Markers of accelerated aging in psychosis span different biological systems including shorter telomere length, increased inflammatory markers, and functional decline in the context of cognitive decline, among others.

Among the treatment options for these disorders is the antipsychotic, clozapine (CLZ), which is prescribed for patients with treatment-resistant PPD. CLZ is an atypical antipsychotic that has demonstrated greater efficacy than other first- and second-generation antipsychotics. It is exceptionally effective in the treatment of PPD symptoms and is the only medication indicated for the treatment of refractory or drug-resistant schizophrenia.

The aim of this research was to investigate the relationship between the methylome, cognitive impairment, premature aging, and pharmacological response to CLZ in patients with primary psychotic disorders.

Analyzes of epigenetic age, telomere length (TL), and mitochondrial DNA copy number (mtDNA-CN) were performed. Epigenetic age was compared between patients under treatment with CLZ and patients without prior psychopharmacological treatment. Regarding TL and mtDNA-CN markers, patients under treatment with CLZ and healthy control subjects were compared.

Overall, patients treated with CLZ had a lower Δ age than patients without psychopharmacological treatment. Furthermore, the comparisons between elderly and young patients, and according to the CLZ treatment period showed significant differences. Importantly, the enrichment analysis of biological pathways involved in CLZ long-term treatment revealed an hypomethylation of the longevity regulatory pathways genes.

On the other hand, patients treated with CLZ had higher TL and higher mtDNA-CN than control subjects.

In summary, the results obtained regarding DNA methylation, LT and mtDNA-CN suggest that long-term treatment with CLZ could have a geroprotective effect in patients with primary psychotic disorder.

Keywords: Clozapine, aging, methylome, telomeres, mitochondrial DNA.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los trastornos psicóticos representan un problema de salud a nivel mundial. Estos tienen como causa diversos trastornos mentales, por ejemplo, la esquizofrenia, el trastorno bipolar, el trastorno esquizoafectivo, entre otros; además de estos, pueden ser una manifestación de otras enfermedades, como la epilepsia e incluso presentarse secundariamente tras el uso de algunos medicamentos o sustancias de abuso.

Debido a la gran variedad de causas existen distintas maneras de clasificar a la psicosis, sin embargo, en esta investigación nos centramos en los trastornos psicóticos primarios, los cuales se definen como aquellos que no son debidos a otra enfermedad ni al consumo de sustancias de abuso.

Entre los principales signos y síntomas de la psicosis se encuentran las alucinaciones, delirios, comportamiento y lenguaje desorganizado, entre otros.

A lo largo del tiempo se han realizado investigaciones que han permitido ampliar el conocimiento de este tipo de trastornos, desde las causas, la evolución y el tratamiento entre otros aspectos. Sin embargo, existen muchos elementos que aún no se conocen en su totalidad y que es necesario estudiar. Dentro de estos, es de suma relevancia determinar el impacto que tiene el envejecimiento biológico en el desarrollo de estos trastornos o bien, si dicho envejecimiento es consecuencia de la psicosis, ya que los pacientes con trastornos psicóticos muestran una esperanza de vida menor a la de la población general. Asimismo, la severidad de la enfermedad, respuesta al tratamiento farmacológico y la progresión también son campos de investigación que deben seguirse explorando para un mejor entendimiento y atención de estos pacientes.

Existen diversas maneras de analizar el envejecimiento biológico, sin embargo, dentro de las herramientas más reconocidas se encuentran los relojes epigenéticos, basados en la metilación del DNA, la longitud telomérica y el número de copias de DNA mitocondrial, ya que, de manera individual, cada uno de estos se ha logrado asociar tanto con la edad cronológica, como con cambios a lo largo del tiempo.

Dado que en las investigaciones publicadas se tiene resultados controversiales en cuanto a la asociación del envejecimiento biológico con los trastornos psicóticos, es necesario

continuar investigando en distintas poblaciones del mundo, ya que nuestros factores genéticos y el entorno pueden estar jugando un papel importante en estos marcadores. De igual forma conocer la correlación que guardan las distintas formas de medir el envejecimiento biológico, o si funcionan de manera independiente sería una mejor forma de entender estos procesos de envejecimiento natural y asociado a los trastornos psicóticos.

2. MARCO TEORICO

2.1 Los trastornos psicóticos

Los trastornos mentales representan un serio problema de salud pública con un alto coste social y afectación a la población sin distinción de edad, sexo, nivel socioeconómico o cultural (1). En un informe de políticas de salud del 2022, la OMS pone de relieve a la salud mental como una prioridad, resaltando que los trastornos mentales, neurológicos y por el consumo de sustancias representan el 10% de la carga mundial de morbilidad y el 30% de las enfermedades no mortales (2).

Un trastorno mental es una condición caracterizada por la alteración clínicamente significativa de la cognición, la regulación emocional o el comportamiento de un individuo. Por lo general, está asociado a angustia o a discapacidad funcional en otras áreas importantes de los individuos (3).

Hace alrededor de medio siglo la Asociación Psiquiátrica Americana (*American Psychiatric Association*), introdujo una herramienta para la clasificación y diagnóstico de enfermedades mentales, el denominado Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales conocido como DSM (del inglés, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, DSM), que ha sufrido una serie de cambios hasta la actualidad y que junto con la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE) integran los criterios diagnósticos más utilizados en la práctica de la psiquiatría (4). De acuerdo con estos instrumentos se pueden identificar distintos tipos de trastornos psicóticos, entre los que se encuentran: La esquizofrenia (ESQ), el trastorno esquizofreniforme, el trastorno esquizoafectivo y el trastorno psicótico breve, que en conjunto constituyen los trastornos psicóticos primarios (TPP). Los trastornos psicóticos originados por otras afecciones médicas o causados por consumo de sustancias de abuso o medicamentos se denominan trastornos psicóticos secundarios (TPS) (5).

Los TPP son considerados enfermedades mentales graves ampliamente heterogéneas que causan ideaciones, y percepciones anormales, y se caracterizan por anomalías en: El pensamiento, la percepción, las emociones, el lenguaje, la autopercepción y la conducta del paciente. Las crisis psicóticas generalmente se presentan con alucinaciones (visuales, auditivas o percibir algo no existente) y delirios (ideas persistentes que no se ajustan a la realidad y de las que el paciente está firmemente convencido, incluso cuando hay pruebas de lo contrario). Además, hay otras manifestaciones clínicas como el pensamiento y movimientos desorganizados y/o síntomas negativos (es decir, embotamiento afectivo, alogia, asocialidad, anhedonia o abulia), los cuales no son debidos a los efectos de una sustancia o un medicamento que afecte el sistema nervioso central, y no son secundarios a otra afección médica (p. ej., una enfermedad cerebral), tumor o una enfermedad autoinmune o un trastorno del estado de ánimo (depresión o manía) (6).

Los TPS que incluyen los trastornos psicóticos debido a otras afecciones médicas y los causados por el consumo de sustancias de abuso o medicamentos son caracterizados por alucinaciones o ideas delirantes que son originados por otro trastorno físico, efecto directo de una sustancia o la abstinencia de dicha sustancia (7,8).

Los TPP, especialmente la ESQ, generalmente evolucionan a través de etapas premórbidas, prodrómicas, sindrómicas, progresivas y crónicas. Sin embargo, el curso de la enfermedad es impredecible y la frecuencia, el número y los tipos de síntomas psicóticos varían según el trastorno psicótico específico y pueden diferir de un paciente a otro con el mismo trastorno (9). Estos padecimientos generalmente inician sus manifestaciones en la adolescencia tardía / edad adulta temprana como el resultado final de un proceso anormal de desarrollo neurológico probablemente moldeado por una combinación del componente genético, factores pre y perinatales y estrés ambiental (10).

En los TPP existen cinco síntomas principales: Alucinaciones, delirios, pensamiento desorganizado (habla), movimiento desorganizado o anormal (incluida la catatonia) y síntomas negativos (11).

2.1.1 La esquizofrenia

La ESQ es un trastorno mental crónico, grave y discapacitante, que afecta aproximadamente al 0.45% de la población adulta mundial (12). Se trata de un trastorno clínicamente heterogéneo que incluye síntomas positivos, negativos y cognitivos. Los

síntomas positivos incluyen alucinaciones visuales y auditivas, delirios, conducta suspicaz y comportamiento motor anormal. Los síntomas negativos incluyen embotamiento, alogia, asocialidad, anhedonia y abolición; y los síntomas cognitivos comprenden falla de atención, habla y/o pensamiento desorganizado, entre otros (13).

El desarrollo de la ESQ se ha relacionado con múltiples cambios funcionales y neuroquímicos cerebrales tales como la regulación dopaminérgica y la función del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), además de la participación de factores genéticos, factores de nacimiento y de la vida temprana del paciente conjuntamente contribuyen de manera considerable en la presentación de este trastorno (14).

2.1.2 El trastorno bipolar

El trastorno bipolar (TB) es una enfermedad psiquiátrica crónica que se caracteriza por la presentación repetida de episodios con cambios agudos del estado de ánimo con características clínicas eufóricas, depresivas o mixtas (15), frecuentemente asociados con deterioro cognitivo y funcional (16). Los síntomas maníacos incluyen estado de ánimo eufórico o irritable, aumento de energía o actividad, muy poca necesidad de sueño, niveles extremos de autoconfianza y locuacidad extrema. Los síntomas depresivos incluyen mal humor, disminución de la capacidad para experimentar placer, poca energía y sentimientos de inutilidad (17).

Biológicamente, dentro de las posibles causas del TB han llamado la atención los sistemas de transducción de señales intracelulares: del metabolismo del inositol y de la señalización del calcio intracelular (respaldada por estudios genéticos y celulares). La desregulación del calcio da como resultado la hiper excitabilidad de las neuronas serotoninérgicas, particularmente susceptibles al estrés oxidativo (18).

Típicamente el TB se presenta en la adolescencia tardía o la edad adulta temprana, sólo una minoría de los casos se presenta en la niñez. Los síntomas del TB pueden variar con el tiempo, no obstante, se requiere tratamiento de por vida. Un tratamiento adecuado puede ayudar a las personas a controlar sus síntomas y mejorar su calidad de vida (19).

2.1.3 El trastorno esquizoafectivo

Al igual que la ESQ, el trastorno esquizoafectivo (TE) es un trastorno psicótico heterogéneo que frecuentemente causa una discapacidad importante, y se acompaña de síntomas como delirios, alucinaciones, desorganización del pensamiento y deterioro cognitivo. En el TE, los síntomas psicóticos están presentes, junto con episodios de depresión o manía (20).

El 30% de los casos con TE ocurren entre los 25 y los 35 años de edad (21), con una mayor frecuencia en las mujeres (22). El TE representa aproximadamente un tercio de la frecuencia de la ESQ, y su prevalencia a lo largo de la vida parece rondar el 0.3 %. Se estima que entre el 10-30% de los ingresos hospitalarios por psicosis se deben a casos con TE (21).

2.1.4 El tratamiento de trastornos psicóticos

La piedra angular del tratamiento para la ESQ y otros TPP consiste en la administración de un grupo amplio de medicamentos, conocidos como neurolépticos o antipsicóticos que incluyen agentes terapéuticos típicos (de primera generación) y atípicos (de segunda generación). A pesar de este repositorio farmacológico, los medicamentos antipsicóticos tienen una eficacia limitada y se ha reportado que ≈30% de los pacientes no responden al tratamiento antipsicótico (23).

La clozapina (CLZ) es un antipsicótico atípico con un perfil farmacodinámico complejo, que ha demostrado mayor eficacia que el resto de antipsicóticos de primera y segunda generación (24). Es excepcionalmente eficaz en el tratamiento de los síntomas de los TPP (25) y es el único medicamento indicado para el tratamiento de la ESQ refractaria o farmacorresistente. La ESQ refractaria se define como el fracaso frente al uso de dos antipsicóticos previos por cualquier motivo. Se ha reportado que hasta el 70% de los pacientes refractarios demuestran una mejoría en los síntomas con CLZ, pero el 30% restante se considera súper refractario (23).

La CLZ es metabolizada a través de las enzimas microsomales hepáticas CYP1A2 y CYP3A4, y uno de sus dos principales metabolitos, la N-desmetil-clozapina (o norclozapina), es farmacológicamente el principio activo (24).

Si bien la naturaleza de los TPP puede deberse a alteraciones del neurodesarrollo, éstos también se caracterizan por mostrar un envejecimiento acelerado, lo que indica que los

procesos de envejecimiento son más rápidos tras el inicio de la enfermedad. Los marcadores de envejecimiento acelerado en la psicosis abarcan diferentes sistemas biológicos e incluyen un acortamiento telomérico, así como marcadores inflamatorios aumentados y deterioro funcional en el contexto del funcionamiento cognitivo (10).

2.2 El envejecimiento biológico

La edad cronológica es un factor de riesgo importante para el deterioro funcional, la presencia de enfermedades crónicas y la mortalidad. Sin embargo, existe una gran heterogeneidad en los resultados de salud de las personas adultas mayores (26). El envejecimiento es un proceso biológico complejo que va disminuyendo de manera progresiva la capacidad de adaptación de las células, tejidos y órganos ante las diferentes etapas de la vida (27).

El envejecimiento está impulsado por características que cumplen las 3 premisas siguientes: (1) Manifestación asociada a la edad, (2) Aceleración del envejecimiento acentuándolas experimentalmente, y la (3) Oportunidad de desacelerar, detener o revertir el envejecimiento mediante intervenciones terapéuticas sobre ellas. Actualmente se han propuesto doce características propias del envejecimiento: Inestabilidad genómica, desgaste de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, macroautofagia inactivada/inhabilitada, detección desregulada de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de las células madre, comunicación intercelular alterada, inflamación crónica y disbiosis (28). Debido a que el envejecimiento biológico cumple con los criterios de diagnóstico, mecanismos, curso, resultados de la enfermedad, intervenciones conocidas y vínculos con factores genéticos y ambientales, este podría ser considerado por la CIE como una enfermedad (29).

2.3 Los marcadores de envejecimiento biológico

El envejecimiento acelerado se observa comúnmente en varias enfermedades crónicas, lo que favorece el incremento de afecciones médicas relacionadas con el envejecimiento y esto a su vez acorta la etapa productiva de las personas (30).

Los relojes biológicos representan una oportunidad importante para buscar y ayudar a comprender el envejecimiento. La investigación sobre los cambios que se dan en la edad biológica entre individuos con edad cronológica similar puede ayudar a esclarecer cómo

distintos factores ambientales impactan en el envejecimiento biológico. Se han propuesto distintas herramientas considerados como “relojes”, con precisión variable en la predicción de la edad cronológica, pero los más prometedores y reproducibles se han basado en la longitud de los telómeros (LT) y la metilación del DNA (DNAm) (31).

2.3.1 La metilación en el DNA

Los cambios epigenéticos conducen a modificaciones fenotípicas sin alteraciones en el genotipo o secuencia del ADN que generalmente se heredan y que modifican la accesibilidad al DNA y como consecuencia afectan la expresión génica y el proceso de empalme del RNAm (32), entre estos mecanismos se incluyen la metilación del DNA (DNAm), la remodelación de la cromatina y los RNA no codificantes. Algunos de estos cambios están considerados como propios del envejecimiento (33,34), e incluso funcionan como enlace entre los estímulos ambientales y la aparición de enfermedades (35),

La aceleración de la edad epigenética se asocia con varias afecciones, incluyendo a trastornos neurológicos y psiquiátricos como el síndrome de Down, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el TB, y el trastorno de estrés postraumático (36).

Los cambios epigenéticos (ej. La DNAm) pueden reflejar las influencias de los factores de riesgo psicosocial, conductual y de salud relevantes en el envejecimiento natural y también han sido implicados en trastornos psiquiátricos (37). Además, la DNAm es uno de los principales mecanismos epigenéticos asociados con la regulación de la expresión génica, principalmente mediante la metilación de la citosina en los dinucleótido citosina-guanina (CpG); los grupos de CpG de las en regiones ricas en GC (islas CpG) representan aproximadamente el 60% de los promotores de genes humanos (figura 2), y la hipermetilación de los promotores se asocia comúnmente con la represión transcripcional, ya que se da una interrupción del sitio de unión con los factores de transcripción y la inducción de modificaciones bioquímicas de las histonas (38,39).

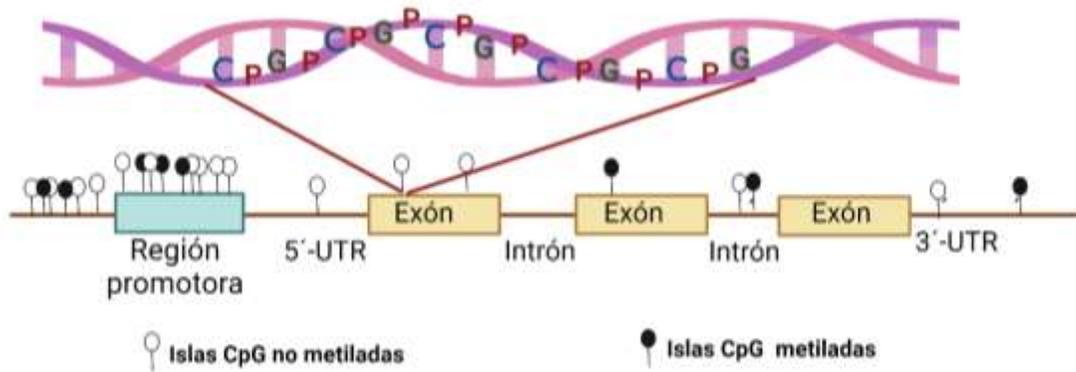


Figura 1. Representación gráfica de islas CpG. Se ejemplifica el tipo de secuencia que se observa en islas CpG y dónde se encuentran con mayor frecuencia. Creado con biorender.com.

Por otro lado, el "reloj" epigenético es una herramienta poderosa que predice fuertemente el envejecimiento biológico en múltiples tejidos y sistemas de órganos en humanos. Los cambios en el envejecimiento epigenético considerado normal, se ha asociado con enfermedades relacionadas con la edad y la mortalidad en general (37).

Las mediciones de edad epigenética en sangre se han reportado como predictores de "todas las causas de mortalidad" después de ajustar por edad cronológica y factores confusores tales como sexo, hipertensión, e historia previa de enfermedades (31,40,41). A la fecha, existen diferentes algoritmos para el cálculo de la edad epigenética, siendo el más aceptado el método de Horvath (42,43) que se basa en el estudio del epigenoma completo (43).

Existe evidencia de un envejecimiento biológico acelerado en pacientes con TPP en comparación con sujetos sanos. En los TPP, la edad biológica y el envejecimiento epigenético se correlacionan inversamente con factores como el soporte psicosocial y el desempeño cognitivo objetivo de los pacientes; mientras que la severidad de la ansiedad se correlaciona positivamente con el envejecimiento acelerado (37).

2.3.2 La longitud telomérica

Otro de los marcadores de envejecimiento biológico ampliamente estudiado es la longitud telomérica (LT), que se refiere al número de repetidos del hexanucleótido 5'-TTAGGG-3' que actúa como protector en los extremos de los cromosomas eucariotas, disminuyendo con cada división celular (figura 1), estando así directamente asociados con el envejecimiento, por lo que han ganado especial atención en el campo de los biomarcadores

envejecimiento (44,45). La LT está determinada en gran medida genéticamente, pero también depende de factores ambientales y del desarrollo. Se ha demostrado que el acortamiento de la LT puede provocar senescencia celular y daño en el DNA y está directamente asociado con enfermedades relacionadas con la edad, trastornos neurodegenerativos y algunas enfermedades psiquiátricas (46).

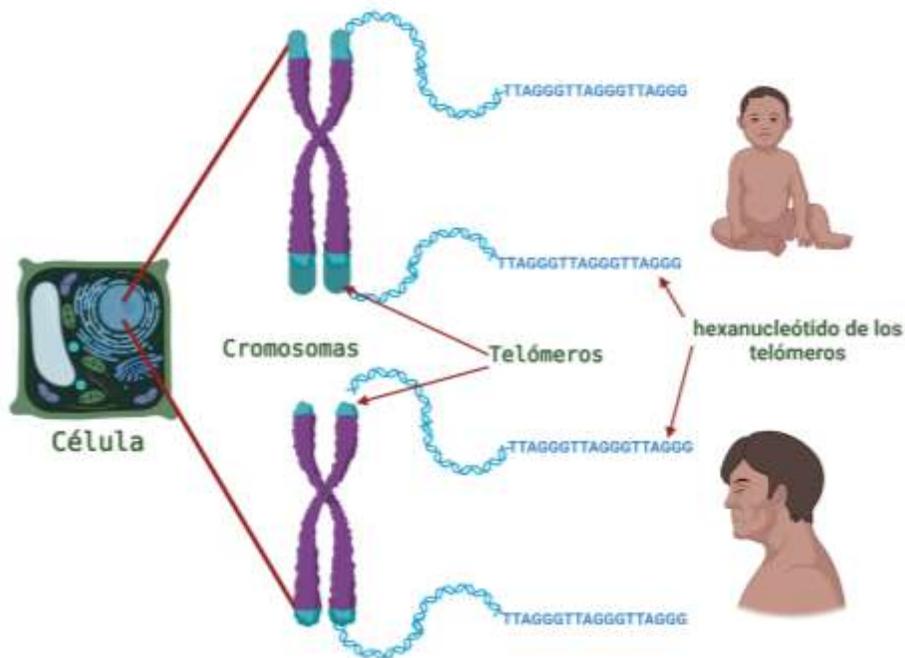


Figura 2. Representación gráfica de la disminución de la longitud telomérica con el paso del tiempo. Representación gráfica de la secuencia, ubicación y tamaño de los telómeros en los cromosomas humanos y cómo sufren cambios en el tamaño de estos de acuerdo con paso del tiempo, es decir, con cada división celular. Creado con BioRender.com.

La disminución crítica en la LT desencadena inestabilidad genómica y apoptosis celular. En las células somáticas como los leucocitos, los telómeros disminuyen su longitud con el paso del tiempo, es decir, son más cortos en la edad avanzada comparado con edades tempranas; y esto se debe a que con la división celular existe una disminución de la actividad de la telomerasa. Por lo tanto, el estudio de la LT en tejidos accesibles como lo es la LT leucocitaria (LTL) ayuda a reflejar en gran medida la edad biológica celular. Sin embargo, el acortamiento telomérico también se ha asociado con la presencia de factores estresantes, como diversas enfermedades físicas y enfermedades mentales. De hecho, varios estudios han documentado LT corta en individuos con estrés psicológico y con diversas enfermedades psiquiátricas, incluyendo al trastorno depresivo mayor, la ESQ, los

trastornos de ansiedad, el trastorno de estrés postraumático y el TB; sin embargo, estas asociaciones son controversiales debido a que no son hallazgos generalizados (44).

El acortamiento telomérico se han asociado con un mayor riesgo de muerte prematura en la población general, pero no se ha dilucidado si dicho acortamiento es la causa o solo representa un factor de riesgo para la muerte prematura (47).

Por otro lado, se sabe que, factores como la edad, el sexo, la obesidad, el tabaquismo y el estilo de vida influyen en la LT (48), por lo que tales factores podrían influir en el envejecimiento acelerado de los pacientes con TPP.

2.3.3 El número de copias del DNA mitocondrial

Otro potencial reloj biológico es el número de copias del DNA mitocondrial (DNAmt), que está estrechamente asociado con la función mitocondrial. Este marcador es relevante para el envejecimiento biológico ya que el envejecimiento se ha asociado constantemente con una disfunción progresiva en la actividad de la cadena respiratoria y la disfunción mitocondrial acumulativa (30). En consecuencia, algunos estudios han encontrado correlaciones significativas entre el número de copias del DNAmt (mtDNA-CN) y la edad cronológica en ciertos tejidos en modelos animales (49). Además, en estudios con humanos se ha relacionado un número elevado de mtDNA-CN en la sangre con una mejor salud y supervivencia entre las personas mayores (50). Es importante destacar que, si bien el mtDNA-CN y la LT se han correlacionado significativamente, estudios recientes sugieren que la edad cronológica no correlaciona con estos dos marcadores y que en consecuencia, predicen de manera independiente la edad biológica (30).

La disfunción mitocondrial está implicada en el envejecimiento y en procesos patológicos, como la carcinogénesis y la inflamación. Las células de los mamíferos contienen diferentes cantidades de mitocondrias, que van desde cientos hasta varios miles de ellas. Su número y forma cambian constantemente en respuesta a la demanda de energética, el estrés oxidativo y las condiciones patológicas. Una mitocondria única contiene en promedio de 2 a 8 copias de moléculas circulares de DNAmt (51).

Algunos estudios han evaluado la influencia de la ESQ en mtDNA-CN. Los resultados al respecto son controversiales, ya que algunos autores encontraron un menor número de copias de DNAmt en tejidos cerebrales y linfocitos periféricos de pacientes con ESQ en

comparación con controles sanos. Sin embargo, otros estudios no han encontrado mtDNA-CN anómalo o diferente en los tejidos de pacientes con ESQ vs controles sanos (52,53).

2.4 El deterioro cognitivo en los trastornos psicóticos

El curso clínico de la ESQ y otros TPP a menudo implica un deterioro cognitivo progresivo, así como alteraciones en síntomas afectivos y funcionamiento social. Existen estudios de cognición y estructura cerebral que respaldan un factor de desarrollo neurológico temprano en su etiología (54,55), pero también hay evidencia de cambios progresivos en algunas estructuras cerebrales de materia gris y blanca, que aparecen solo después del inicio de la enfermedad (56). Por lo tanto, algunos estudios continúan aportando evidencia de una hipótesis de envejecimiento acelerado, es decir, la suposición de que algunos de los cambios observados en la ESQ se parecen a los del envejecimiento fisiológico (57). La ESQ es una condición que presenta muchas coincidencias en cambios funcionales en diversas áreas donde comúnmente se detectan cambios con el envejecimiento. Los cambios relacionados con el envejecimiento en la cognición y el funcionamiento cotidiano tienen un impacto diferencial en los dominios cognitivos y las áreas de habilidades funcionales. En las personas con ESQ también hay un perfil de deficiencias en las capacidades cognitivas (58). Incluso se ha observado que en personas que presentan un primer episodio psicótico no afectivo presentan deterioro cognitivo comparado con sujetos control (59).

La mayoría de los pacientes con TB muestran deterioro neurocognitivo, en algunos meta-análisis reportan que los dominios más afectados (de moderado a alto) son: La atención, el aprendizaje verbal, la memoria, y las funciones ejecutivas, mientras que la inteligencia premórbida parece preservarse (cambios y signos puntuales que pueden presentarse antes de padecer una alteración mental severa) (60).

La investigación sobre el valor del deterioro cognitivo para la predicción de un mal resultado funcional psicosocial en la psicosis ha ganado interés e importancia en los últimos años, basado en un mayor conocimiento sobre que el dominio cognitivo tiene mayor poder predictivo que los dominios de síntomas. Sin embargo, la naturaleza de la asociación del deterioro cognitivo con el funcionamiento psicosocial aún permanece en investigación (61).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los TPP representan un importante problema de salud en la población y en las personas que presentan alguno de estos trastornos se ha identificado una menor esperanza de vida, falta de respuesta al tratamiento farmacológico en cierto porcentaje de estos pacientes y déficit cognitivo. Existe evidencia que sugiere que los pacientes con TPP presentan procesos de envejecimiento acelerado, tanto por disminución en la LT, el mtDNA-CN y la mDNA, sin embargo, esta información aun es limitada y sobre todo en población mexicana hasta el momento no existen estudios en los que se investigue la relación entre los marcadores de envejecimiento y su relación con el tratamiento con CLZ. Es por ello por lo que fue de suma importancia analizar la relación de los marcadores de envejecimiento (mDNA, LT, mtDNA-CN), así como, la relación que existe entre cada uno de ellos y el tratamiento con CLZ.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Tiene el metiloma algún impacto o influencia en el deterioro cognitivo, el envejecimiento prematuro y la respuesta farmacológica en pacientes con trastornos psicóticos primarios bajo tratamiento con CLZ?

5. HIPÓTESIS

Los cambios en el metiloma influyen en el deterioro cognitivo, el envejecimiento prematuro y la respuesta farmacológica a CLZ en pacientes con trastornos psicóticos primarios.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Investigar la relación entre el metiloma, el deterioro cognitivo, el envejecimiento prematuro y la respuesta farmacológica a CLZ en pacientes con trastornos psicóticos primarios.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar los patrones globales de metilación de DNA en pacientes con trastornos psicóticos primarios y en sujetos control.

- Evaluar el envejecimiento prematuro mediante el análisis de la longitud telomérica y número de copias de DNA mitocondrial en pacientes con trastornos psicóticos primarios y en sujetos control.
- Analizar los datos de metilación del DNA y su correlación con el envejecimiento, cognición y respuesta a clozapina en pacientes con trastornos psicóticos primarios.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño del estudio.

Estudio analítico y observacional que incluyó pacientes con TPP provenientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNNMVS) y sujetos controles sanos pareados por edad y género.

7.2 Población de estudio.

7.2.1 Pacientes

Se reclutaron 58 pacientes diagnosticados con ESQ, TEE o TB en la consulta externa del INNNMVS y que se encontraban bajo tratamiento con CLZ (figura 3).

De cada paciente se registraron datos sociodemográficos: Edad, sexo, antecedentes heredofamiliares, peso, talla, índice de masa corporal (IMC), presión arterial, hábitos de alcohol, hábito de fumar (en número y frecuencia), consumo de cafeína, apoyo de redes sociales, co-tratamiento y dosis de medicamentos, hábitos de ejercicio y ocupación.

Adicionalmente se incluyeron los datos del metiloma de 56 muestras de pacientes sin tratamiento psicofarmacológico como controles para el análisis comparativo. Estos datos fueron proporcionados por varios colaboradores: Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N Navarro, División Académica de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), División Académica Multidisciplinaria de Comalcalco, UJAT, División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, UJAT (figura 3).

7.2.1.1 Criterios de inclusión

- Pacientes mestizos mexicanos (MM) hombres y mujeres de 18-50 años.
- Pacientes con diagnóstico de ESQ, TEE o TB que acudieron a consulta externa del INNNMVS, que acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.

- Pacientes que encontraban bajo tratamiento farmacológico con CLZ.
- Escolaridad mínima de 6 años.

7.2.1.2 Criterios de exclusión

- Pacientes mayores a 50 años.
- Pacientes que no aceptaron participar en el estudio.
- Pacientes con falta de adherencia al tratamiento con CLZ.

7.2.2 Controles

Se analizaron 58 sujetos mestizos mexicanos (MM) hombres y mujeres de 18-50 años, sin antecedentes de enfermedades neurológicas y psiquiátricas para análisis de la LT y mtDNA-CN (figura 3).

7.2.2.1 Criterios de inclusión

- Sujetos que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.
- Hombres y mujeres MM sanos de 18-50 años.
- Sujetos sin antecedentes de enfermedades neurológicas y psiquiátricas.
- Sujetos con una escolaridad mínima de 6 años.

7.2.2.2 Criterios de exclusión

- Individuos extranjeros o mexicanos con más de un ascendente extranjero (no español).
- Sujetos que tuvieron antecedentes de enfermedades neurológicas o neuropsiquiátricas.
- Sujetos con escolaridad menor a 6 años.

7.2.3 Consideraciones éticas.

El protocolo fue aprobado por los Comités de Ética y de Investigación (CEI), tanto del INNNMVS (número de registro 38/19), como de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (Sesión 10/12, acuerdo 10/12,8.3). El proyecto recibió financiamiento CONAHCYT #233695 y por el proyecto NPTC, convenio 919018. Todos los individuos participantes firmaron carta de consentimiento informado (CCI) (Anexo I y Anexo II) para

participar en el estudio, y así garantizar que fueran respetados sus derechos humanos con apego a los lineamientos internacionales de ética en investigación. Previamente, se otorgó información clara y concreta a pacientes y familiares sobre el estudio y su participación en el mismo haciendo énfasis en que su inclusión sería voluntaria y que sus datos serían confidenciales.

Se asignó una clave de identificación y un número consecutivo a las muestras biológicas de los pacientes y controles, de acuerdo con las bases de datos del Departamento de Genética del INNNMVS y el Laboratorio de Genética Molecular N-103 de la UAM Xochimilco para asegurar la confidencialidad y resguardo de los datos de cada persona.

7.3 Métodos

7.3.1 Toma de muestra

Siguiendo los lineamientos éticos vigentes, y posterior a la obtención del CCI de los pacientes y sujetos control, se llevó a cabo la toma de muestra de sangre periférica (18 mL) en tubos Vacutainer® con anticoagulante citratos-dextrosa (ACD). Las muestras sanguíneas se conservaron en refrigeración a 4° C hasta su procesamiento.

7.3.2 Extracción de DNA

Antes de realizar la extracción del DNA se separó una fracción del paquete leucocitario y se conservó a -20° C en *RNAlater*® (Estabilizador y protector de ácidos nucleicos y proteínas) para su posterior tratamiento y extracción de RNA.

La extracción del DNA genómico de las muestras se realizó por un método de sales. Se verificó la calidad y concentración del material genético a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% y por espectrofotometría, respectivamente.

7.3.3 Generación de la base de datos de pacientes y controles

Se registró la siguiente información de los 58 pacientes incluidos en el estudio, a los que se realizó análisis de LT y mtDNA-CN.

Datos sociodemográficos: edad, sexo, antecedentes heredofamiliares, peso, talla, IMC, presión arterial, hábitos sobre el consumo de alcohol, hábito de fumar (en número y frecuencia), consumo de cafeína, drogas, hábitos de ejercicio, años de estudio y ocupación.

Datos clínicos: Diagnóstico, tratamiento, edad de inicio, dosis de medicamento, co-tratamiento, años de tratamiento, efectos adversos y comorbilidades.

Psicológicos: Resultado de las evaluaciones psicológicas CASI (*Cognitive Abilities Screening Instrument*), MoCA (*Montreal Cognitive Assessment*) e INECO (*Frontal Screening*).

Psiquiátricos: calidad de vida (CGI), PANSS (*Positive and Negative Syndrome Scale*), realizadas por el departamento de Psiquiatría del INNNMVS.

Bioquímicos: Niveles de CLZ y de su metabolito activo dmCLZ (N-desmetil clozapina) en plasma para evaluar el radio metabólico o tasa metabólica.

7.3.4 Determinación de patrones de metilación global

Se realizó la modificación del DNA con bisulfito de sodio utilizando el EZ DNA *Methylation Kit* (Zymo Research)[®] para diferenciar las citosinas metiladas de las no metiladas, y así poder realizar el análisis de metilación del DNA. Se analizó el metiloma utilizando el *Infinium Methylation EPIC BeadChip* (Illumina)[®], el cual interroga cuantitativamente más de 850,000 sitios CpG de metilación de todo el genoma con resolución de un solo nucleótido (EWAS. *Epigenome wide association study*).

Para evaluar el efecto de la metilación del DNA en potenciadores o promotores, los umbrales de distancia para la detección de pares CpG se establecieron a 1Mb, 100kb y 50kb “río arriba o abajo” del sitio de inicio de la transcripción del(os) gen(es) correspondiente(s). Una correlación significativa se consideró cuando el valor de p de dos colas sea $p < 0.05$, después de corrección múltiple con el método de Benjamini-Hochberg *False Discovery Rate* (FDR) para descartar falsos positivos (62).

Se utilizó *Genome Reference Consortium Human Build 37* (GRCh37/hg19) como genoma de referencia de posición para todos los análisis realizados. Las intensidades de fluorescencia se midieron con el equipo *iScan* y se transformaron en archivos *idat* con el algoritmo implementado en el programa *GenomeStudio* (Illumina, San Diego, CA, EE. UU).

Se realizó el análisis de los datos crudos (raw data) obtenidos del microarreglo mediante *Bioconductor*, un proyecto de código abierto (<https://www.bioconductor.org/>) en el que se incluye el programa *ChAMP* en la plataforma R para el análisis de los datos.

Para el control de calidad se utilizó el paquete *ChAMP* (63). Se eliminaron las señales de las sondas que se salían de los siguientes parámetros: (i) Valor p de detección superior a 0.01; (ii) Menos de tres microesferas en menos del 5 % de las muestras; (iii) Todos los sitios no CpG; (iv) Sondas asociadas a SNV; (v) Sondas asociadas con cromosomas sexuales y, (vi) Sondas de múltiples sitios. Además, se eliminaron las muestras con una relación superior a 0.1, lo que resultó en el filtrado de un individuo.

7.3.5 Análisis de los sitios con de metilación diferencial

Se eliminó el efecto de lote (variación técnica sistemática) y se ajustó la proporción de células sanguíneas en la matriz de valores beta normalizados con desconvolución de valor único (*champ.SVD* y *champ.runCombat*) y un análisis de base de referencia (*champ.refbase*) respectivamente (63,64). Una vez realizados los ajustes, se analizaron los sitios metilados diferencialmente mediante modelos lineales implementados en la función *champ.DMP* del paquete informático *ChAMP* (65). Primero, se analizaron los sitios con metilación diferencial (DMP) considerando la importancia en un valor de p inferior a 1e-08. Después de identificar los DMP, se revisaron las regiones con metilación diferencial (DMR) con el algoritmo *ProbeLasso* (66).

Por otro lado, se realizó un análisis FUMA (*Functional Mapping and Annotation of Genome-Wide Association Studies*) para priorizar e interpretar los resultados de GWAS de los 307 genes anotados que se identificaron en las DMR (67).

7.3.6 El cálculo de la edad epigenética

Se normalizó la matriz anterior de valores beta anterior mediante la normalización del cuantil de la mezcla beta (68) y se calcularon las edades epigenéticas con el paquete *ENmix* (69). Este paquete permitió calcular tres relojes epigenéticos: Hannum (70), Horvath (43) *PhenoAge* (71). Las edades epigenéticas calculadas con los relojes Horvath, Hannum y *PhenoAge* y la edad cronológica en ambos grupos se compararon mediante análisis de correlación de Spearman. Posteriormente, se calculó el delta de la edad ($\Delta\text{edad} = \text{edad epigenética} - \text{edad cronológica}$), restando la edad cronológica de la edad epigenética estimada en todas las muestras y por cada reloj. Finalmente, se calculó la Δedad de cada reloj entre los pacientes tratados con CLZ y los pacientes sin tratamiento psicofarmacológico.

En primer lugar, se realizó un análisis estratificado por sexo y edad, comparando los pacientes tratados con CLZ frente a los pacientes sin tratamiento previo. Posteriormente, los pacientes tratados con CLZ se subdividieron en cuatro subgrupos: según el tiempo medio de tratamiento con CLZ en el rango medio en el grupo de pacientes en pocos y muchos años de tratamiento (>9 y ≤ 9 años de tratamiento respectivamente), y según la edad cronológica media (edad promedio = 37 años), en pacientes jóvenes y mayores. Debido al tamaño pequeño tamaño de la muestra, y con el fin de lograr subgrupos con un número similar de pacientes (n), se utilizaron los valores medios de los años de tratamiento con CLZ y la edad cronológica de los pacientes. Para el análisis de estos cuatro subgrupos se aplicó la prueba *t de Student*.

7.3.7 El enriquecimiento de vías e interacciones proteína-proteína

Una vez que se extrajeron los resultados de los genes con sitios y regiones diferencialmente metilados a través de la plataforma *WebGestalt* (kit de herramientas de análisis GENE SeT basado en WEB) (72), se realizó el enriquecimiento de rutas biológicas que los incluyeran. Primero, se analizaron las interacciones proteína-proteína mediante la aplicación de *STRING* (73) entre los productos de genes identificados y se trazaron las interacciones con el programa *Cytoscape* 3.8.1 (74). Debido a que estos resultados incluían a la vía reguladora de la longevidad se realizó un segundo análisis para esta vía en *STRING* (subenriquecimiento) utilizando los resultados de la base de datos de la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG) (75).

7.3.8 La validación de la metilación diferencial por PCR específica de metilación (MS-PCR)

Para llevar a cabo la validación de la metilación diferencial obtenida mediante el EWAS, se realizó la priorización génica considerando que tuvieran alguna implicación clínica con los trastornos psicóticos, la longevidad o ambos, que la metilación diferencial identificada en el microarreglo correspondiera a una isla CpG y, que el sitio con metilación diferencial obtenido permitiera un diseño de oligonucleótidos adecuado de acuerdo con el programa *Methyl primer express* v1.0. Con base en esto, se eligieron tres genes y se procedió al diseño de dos pares de oligonucleótidos para cada gen; uno que permitiera amplificar por PCR las secuencias metiladas y el otro para amplificar las secuencias no metiladas y de esta manera poder diferenciarlas por PCR específica de metilación (MS-PCR).

7.3.9 Estandarización de la MS-PCR

Se realizó para los genes seleccionados mediante la priorización génica. Estos genes fueron *MICA*, *MAPK4* y *FOSO3*, para cada gen se realizaron cuatro reacciones de MS-PCR, dos con el par de oligonucleótidos para DNA metilado y 2 para el par de oligonucleótidos para DNA no metilado.

Las pruebas se iniciaron con el gen *MICA* probando diferentes temperaturas de alineamiento (T_m) y concentraciones de DNA hasta obtener el amplicón deseado. Se realizó el mismo procedimiento con los otros dos genes.

Para los ensayos de metilación es necesario incluir un control de DNA metilado, uno no metilado y un blanco (ensayo sin DNA). El control metilado se obtuvo realizando una reacción con 2 μ g de DNA de muestras control, SAM (S-adenosil-L-metionina) y la enzima *M.Sss1* (CpG Metiltransferasa) e incubando a 37°C durante toda la noche para asegurar la metilación de todo el DNA.

El análisis de metilación se llevó a cabo mediante una conversión del DNA por bisulfito de sodio con el paquete comercial *EZ DNA Methylation-Gold Kit* (Zymo research)[®] de acuerdo con el protocolo del proveedor.

7.3.10 La cuantificación relativa de la longitud telomérica y el número de copias de DNA mitocondrial

Se realizó la cuantificación relativa de la LT y el mtDNA-CN en los 58 pacientes y 58 CT mediante PCR en tiempo real (qPCR), de la siguiente manera: para la LT se midió el hexanucleótido repetido de los telómeros y se normalizó con el gen monocopia HSA de albumina sérica humana (amplicón teórico: 105pb). Mientras que para la cuantificación de mtDNA-CN se amplificó el gen mitocondrial *ND3* que codifica para la subunidad 3 de la NADH deshidrogenasa del complejo I de la cadena respiratoria y se normalizó con el gen de copia única, *TH* que codifica para la tirosín-hidroxilasa, esperando un amplicón de 177 pb.

Cada muestra se analizó por triplicado en el equipo *Quant Studio 5*[®]. Se utilizó el método comparativo $\Delta\Delta CT$ para la cuantificación relativa promedio de la LT y el mtDNA-CN. El valor del número de ciclos de umbral predefinido (ct) de cada gen se utilizó para calcular el número el número de copias repetidas de telómeros o de *ND3* con respecto a la proporción

del número de copias del gen normalizador (*HSA* o *TH*) correspondiente, y así obtener el primer ΔCT en cada muestra de paciente y de control. La segunda derivada, $\Delta\Delta CT$ se calculó restando el $\Delta CT_{\text{del control}}$ al $\Delta CT_{\text{del paciente}}$. Se realizó prueba de normalidad (Sapiro-Wilk) de los datos en ambos casos y para ambos grupos y se aplicó prueba de U de Mann-Whitney para comparar las medias de ambos grupos en muestras con distribución no normal.

7.3.11 La evaluación de la respuesta a la clozapina

Para determinar la respuesta al tratamiento con CLZ se utilizó la escala que evalúa los síntomas positivos, negativos y psicológicos de pacientes con ESQ y TEEA (PANSS). Se consideraron pacientes respondedores a quienes tuvieron una disminución de al menos 30% entre el puntaje de la PANSS inicial y a la semana 18 del tratamiento (fase estacionaria de la CLZ). Estas diferencias se compararon con las calificaciones simultáneas de Impresiones Clínicas Globales (CGI) a la semana cero y a la semana 18. En los pacientes con TPP diferente a ESQ y TEEA, sólo se consideraron las diferencias del CGI del 50%, equivalentes a una mejoría de síntomas de moderados a leves.

8. RESULTADOS

8.1 Características de los sujetos incluidos en el estudio.

Se incluyeron 172 individuos en el estudio, de los cuales 87 fueron analizados en microarreglo divididos en 2 grupos de acuerdo con sus características de tratamiento antipsicótico (figura 3). El primer grupo incluyó a 31 pacientes bajo tratamiento con CLZ, un paciente fue descartado del estudio por mala calidad del DNA extraído (tabla 1).

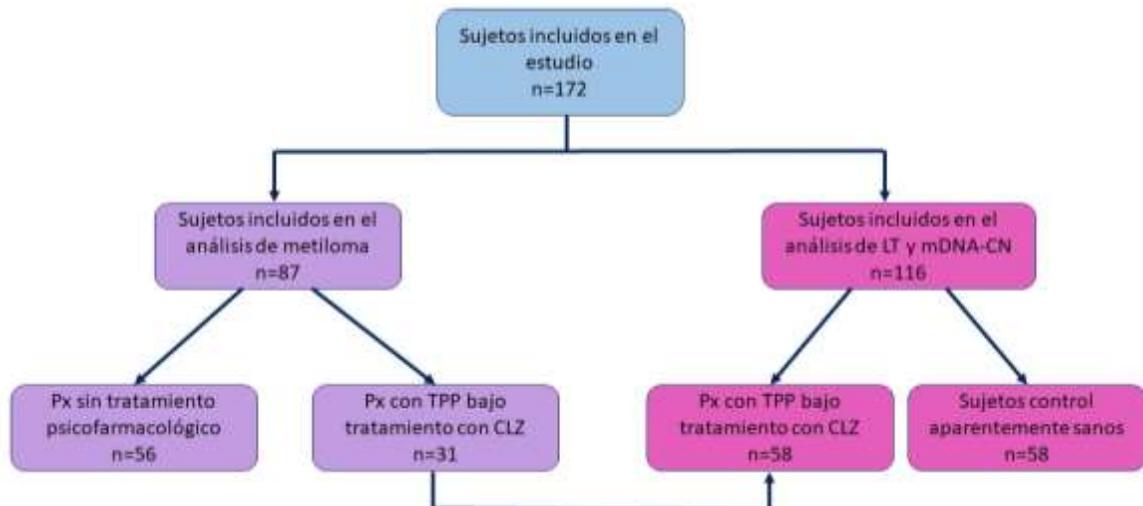


Figura 3. Diagrama de flujo sobre el número de sujetos incluidos en el estudio. Se muestra la n y características de los sujetos incluidos en el análisis de metiloma, LT y mDNA-CN

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con CLZ (n=31) analizados para metiloma.

Característica	N (%) o media ± DE
Edad (años)	37.74 ± 12.18
Sexo	
Masculino	18 (58.1)
Femenino	13 (41.9)
Diagnóstico	
Esquizofrenia	19 (61.3)
Trastorno bipolar	3 (9.6)
Trastorno esquizoafectivo	8 (25.8)
Episodio depresivo psicótico	1 (3.2)
Comorbilidades	
Si	19 (61.3)

No	12 (38.7)
Años de tratamiento con CLZ	9.22 ± 7.54
Tratamiento concomitante	
Si	29 (93.6)
No	2 (6.4)
Consumo de alcohol	
Si	10 (32.3)
No	21 (67.7)
Consumo de drogas	
Si	8 (25.8)
No	23 (74.2)
Consumo de tabaco	
Si	14 (45.2)
No	17 (54,8)
Dosis CLZ (mg/día)	207.76 ± 128.71

El segundo grupo de 56 pacientes con trastornos psiquiátricos, pero sin tratamiento psicofarmacológico/psicotrópico se consideró como grupo control (tabla 2).

Tabla 2. Características clínicas y demográficas de pacientes con trastornos psiquiátricos sin tratamiento psicofarmacológico/psicotrópico (n=56) analizados para metiloma.

Característica	N (%) o media ± DE
Edad (años)	17.12 ± 7.84
Sexo	
Masculino	13 (23.2)

Femenino	43 (76.8)
Diagnóstico	
Trastorno depresivo mayor	19 (33.9)
Trastorno de déficit de atención e hiperactividad	32 (57.1)
Esquizofrenia/psicosis de inicio temprano	5 (9.0)

Para la cuantificación relativa de la LT y el mtDNA-CN se estudiaron 58 pacientes con TPP bajo tratamiento con CLZ (incluidos los 31 pacientes de la Tabla 2). Las características de esta muestra se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Características clínicas del grupo de pacientes con trastornos psicóticos tratados con CLZ (n=58) analizados de la LT y el mtDNA-CN.

Característica	N (%) o media ± DE
Edad (años)	37 ± 11.06
Sexo	
Masculino	36 (62.1)
Femenino	22 (37.9)
Diagnóstico	
Esquizofrenia	35 (60.34)
Trastorno bipolar	8 (13.79)
Trastorno del espectro esquizoafectivo	14 (24.13)
Episodio depresivo psicótico	1 (1.72)

Además, se incluyó un grupo control conformado por 58 sujetos clínicamente sanos sin antecedentes de enfermedades neurológicas y psiquiátricas cuyas características se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Características del grupo control (n=58).

Edad (años)	33 ± 10.04
Sexo	
Masculino	36 (62.1)
Femenino	22 (37.9)

8.2 Localización de los sitios diferencialmente metilados con respecto al gen y a la isla CpG.

Tras el procesamiento bioinformático se identificaron un total de 44,716 DMP entre los pacientes tratados con CLZ y los pacientes vírgenes al tratamiento psicotrópico. De estos, 39,204 sitios (87.7%) se encontraron hipometilados y 5,512 sitios (12.3%) se observaron hipermetilados. La localización fue diversa, donde 9,573 de los sitios hipometilados se encontraban en regiones cercanas al inicio de la transcripción (TSS) TSS200; 7,247 en TSS1500. Además, algunos de estos sitios hipometilados se ubicaron en regiones no traducidas: 306 sitios en regiones 3'-UTR; 5 332 en 5'- UTR; 7,126 en cuerpos de genes; 4,626 en el primer exón y 22 en sitios cercanos a un exón. Por otro lado, la distribución de los sitios hipermetilados fue la siguiente: 138 en TSS200; 265 en TSS1500; 262 en 3'- UTR; 266 en 5'- UTR; 3,111 en cuerpos de genes; 75 en el primer exón y 55 en sitios cercanos a un exón (figura 4A).

Con respecto a la localización de la isla CpG, se identificaron un total de 29,895 sitios en islas CpG, 5808 en mar abierto, 1153 en regiones salientes de la isla y 7860 en la orilla de la isla (figura 4B). De estos, 29,020 sitios en islas CpG, 2,892 sitios en mar abierto, 470 sitios salientes de la isla y 6,822 sitios en orilla de la isla se encontraron hipometilados en muestras de pacientes tratados con CLZ con respecto a pacientes sin tratamiento. Por otro lado, 875 sitios se ubicaron en islas CpG, 2916 sitios en mar abierto, 683 sitios en las

salientes de la isla y 1038 sitios en la orilla de la isla que se encontraron hiper metilados en muestras tratadas con CLZ vs. los pacientes sin tratamiento.

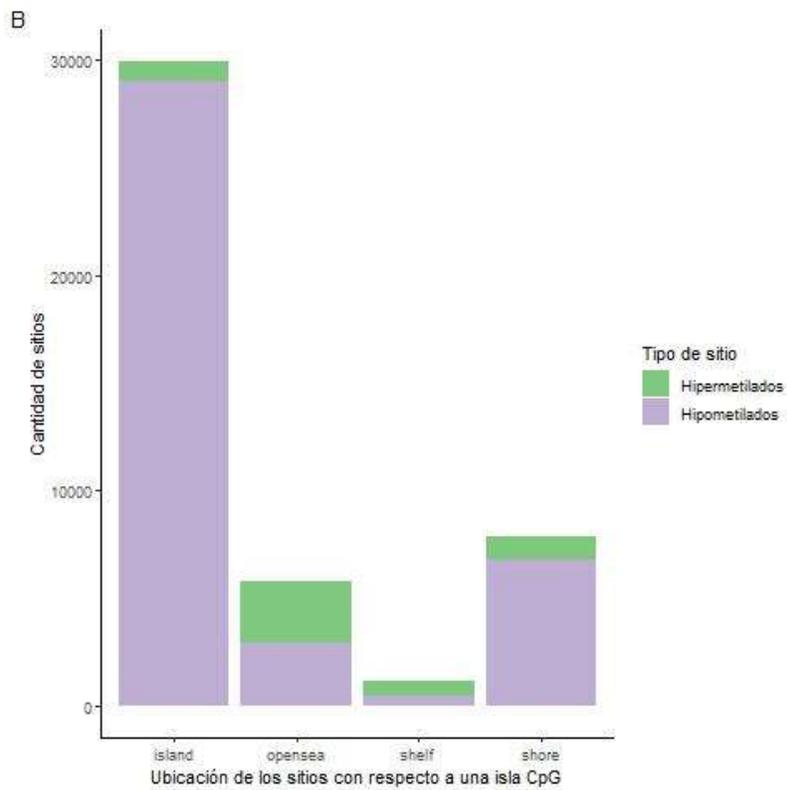
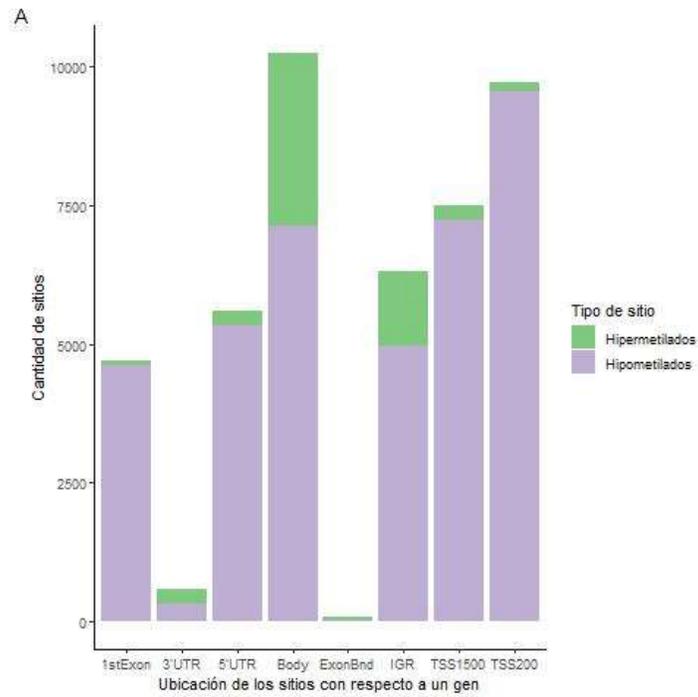


Figura 4. Número de sitios con metilación diferencial y su distribución respecto a un gen y a una isla CpG. El gráfico representa los sitios con metilación diferencial (hiper o hipometilados) de pacientes tratados con CLZ vs. pacientes no tratados. **A)** Ubicación de los sitios con respecto a los genes. TSS1500 (200 a 1500 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción); TSS200 (hasta 200 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción); 5' UTR (región no traducida 5'); 1er exón; Cuerpo (cuerpo del gen); ExonBnd (dentro de las 20 bases de un límite de exón, es decir, el comienzo o el final de un exón), y 3' UTR (región 3' sin traducir). **B)** Ubicación de los sitios con respecto a islas CpG. En el gráfico se muestra la proporción de todos los sitios CpG identificados de acuerdo con su ubicación en relación con las islas CpG. Las costas de las islas indican las regiones costeras que flanquean, <2 kb río arriba y aguas abajo de las islas CpG; Las plataformas insulares indican sitios que se encuentran entre 2 y 4 kb aguas arriba y aguas abajo de las islas CpG), y mar abierto se refiere a sitios no relacionados con las islas CpG.

8.3 Genes involucrados en los sitios con metilación diferencial.

Se realizó el enriquecimiento de vías biológicas de los 13,483 genes identificados en los DMP (hiper e hipometilados). Este análisis indicó enriquecimiento en vías de: Biosíntesis de glucoesfingolípidos, biosíntesis de glicosaminoglicanos, cáncer endometrial, cáncer gástrico, glioma, vía reguladora de la longevidad, melanogénesis, metabolismo de un carbono (o reserva de folatos), vía de señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), adicción a las anfetaminas, replicación de DNA, entre otras con una cantidad considerable de genes involucrados en dichas vías en los que identificamos sitios con metilación diferencial.

Con respecto a los sitios hipometilados, el enriquecimiento de vías incluyó: Biosíntesis de cáncer endometrial, cáncer gástrico, biosíntesis de glicosaminoglicanos, glioma, vía reguladora de la longevidad, proteasoma, vía de señalización de VEGF, adicción a las anfetaminas, arrastre circadiano, síntesis y secreción de aldosterona, apoptosis, invasión bacteriana de células epiteliales, autofagia, adhesión focal, infección por *Vibrio cholerae*, sistema de señalización de fosfatidilinositol, Infección por herpes virus asociada al sarcoma de Kaposi, procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, vía de señalización de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), meiosis de ovocitos, vía de señalización RAS, metabolismo de la pirimidina, miocardiopatía hipertrófica (MCH), vía de vigilancia de RNAm, enfermedad de Alzheimer, entre otros (tabla 5).

Finalmente, el enriquecimiento de las vías en sitios hipermetilados mostró un enriquecimiento en transportadores ABC (por *ATP-Binding Cassette*) y endocitosis (tabla 6).

8.4 Regiones diferencialmente metiladas.

Se identificaron 286 DMR, de las cuales 247 regiones estuvieron hipermetiladas y 39 se encuentran hipometiladas en el grupo tratado con CLZ vs. pacientes sin tratamiento. Se identificaron 307 genes asociados a estas regiones, dentro de los cuales se encontró a *GRHL3*, *LIN28*, *FLAD1*, *FLAD1*, *SYT8*, *TNNI2*, *SLC22A18AS*, *ALX4*, *KLC2*, *RAB1B*, entre otros (figura 5).

De manera sobresaliente, el análisis FUMA reveló a los genes principales, como *NOTCH4*, *MICA*, *TRIM27*, *PBX2* y *FKBPL*, enriquecidos en GWAS de esquizofrenia, agranulocitosis/granulocitopenia inducida por CLZ en esquizofrenia resistente al tratamiento y trastorno bipolar, entre otras afecciones psiquiátricas y no psiquiátricas.

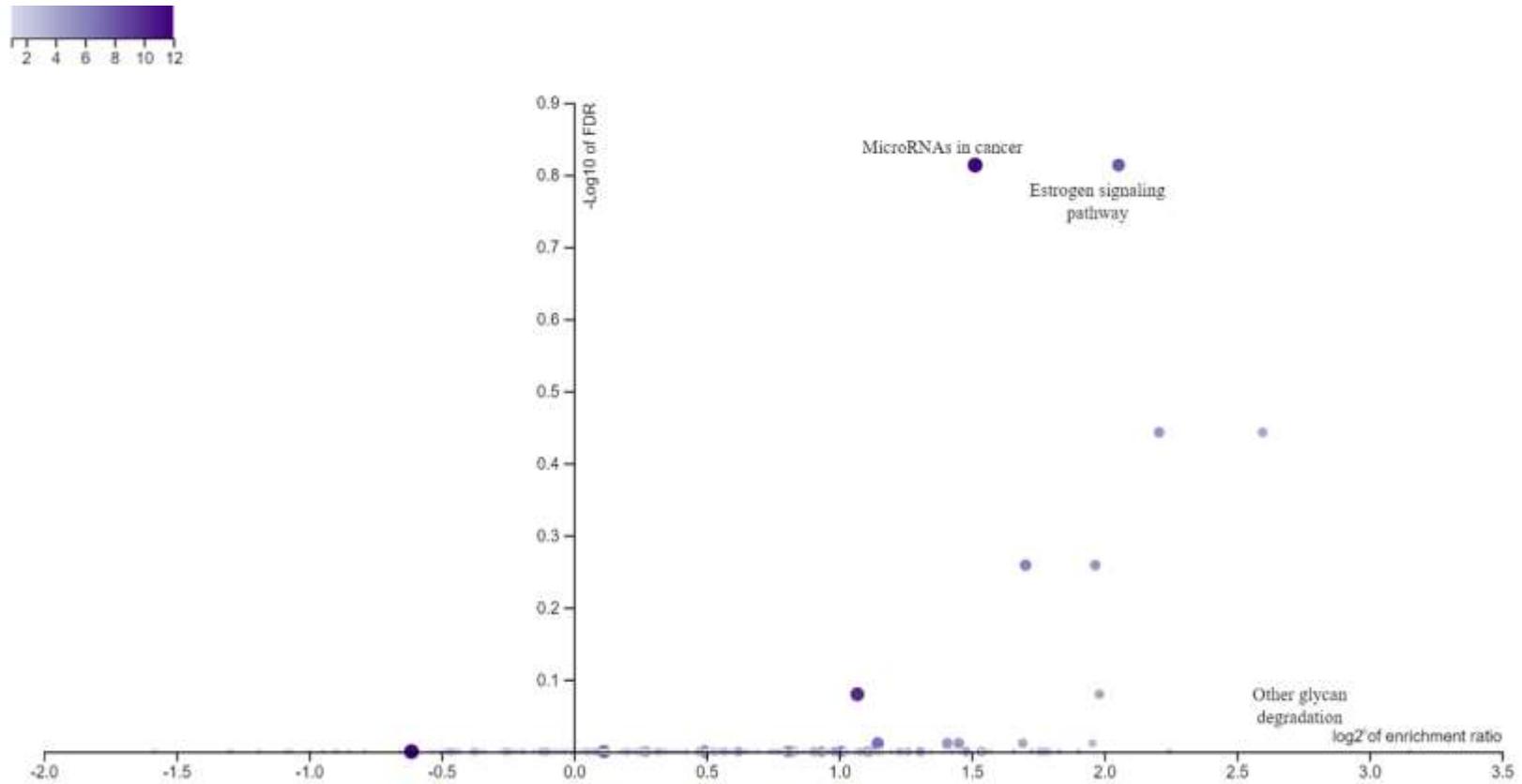


Figura 5. Gráfico de volcán que muestra las rutas enriquecidas de los genes ubicados dentro de las regiones metiladas diferencialmente. En el eje X, se grafican los valores logarítmicos, \log_2 de la relación de enriquecimiento frente a los valores $-\log_{10}$ de la tasa de descubrimiento falso (FDR) para cada vía. El tamaño y el color del punto es proporcional al tamaño de la categoría. La barra de la escala superior izquierda muestra el número de genes obtenidos de nuestros resultados con respecto a los esperados en cada vía. Cuanto más oscuro sea el color, mayor será el número de genes identificados.

Table 5. Enriquecimiento de vías de los sitios hipometilados con metilación diferencial.

Vía	Genes	FDR	Proporción de enriquecimiento	No. de genes esperados/ encontrados
Biosíntesis de glucoesfingolípidos	<i>B3GALT4, B4GALNT1, GLB1, HEXA, HEXB, SLC33A1, ST3GAL1, ST3GAL2, ST3GAL5.</i>	1.8835e-3	1.6557	15/15
Biosíntesis de glicosaminoglicanos	<i>B3GALT6, B3GAT3, B4GALT7, CHPF, CHPF2, CHST11, CHST12, CHST113, CHST14, CHST15.</i>	1.0665e-2	1.4902	20/18
Cáncer endometrial	<i>AKT1, AKT2, APC, APC2, AXIN1, AXIN2, BRAF, BAK1, BAD, BAX.</i>	2.4073e-5	1.4559	58/51
Cáncer gástrico	<i>ABCB1, AKT1, AKT2, APC, APC2, AXIN1, AXIN2, BAK1, BAX, BCL2.</i>	4.2129e-12	1.4557	149/131
Glioma	<i>AKT1, AKT2, BAK1, BAX, BRAF, CALM1, CALM2, CALM3, CALML4, CALML5</i>	1.6280e-5	1.4225	71/61
Vía reguladora de la longevidad	<i>ADCY1- ADCY9, ADIPOR1, AKT1, AKT1S1, AKT2, APPL1, ATF2, ATF4, ATF6B, ATG5, BAX.</i>	1.9266e-6	1.4139	89/76
Melanogénesis	<i>MAP2K2, MAPK1, MAPK3, MC1R, MITF, NRAS, PLCB1, PLCB3, PLCB4, POMC.</i>	5.4973e-7	1.4098	101/86
Reserva de carbono por folato	<i>ALDH1L1, ALDH1L2, AMT, ATIC, DHFR, FTCD, GART, MTFMT, MTHFD1, MTHFD1L.</i>	3.9688e-2	1.4074	20/17
Vía de señalización de VEGF	<i>AKT1, AKT2, BAD, CASP9, CDC42, HRAS, HSPB1, JMJD7-PLA2G4B, KDR, KRAS.</i>	2.0327e-4	1.4032	59/50
Adicción a las anfetaminas	<i>ADCY5, ARC, ATF2, ATF4, ATF6B, CACNA1C, CACNA1D, CALM1, CALM2, CALM3.</i>	1.2191e-4	1.3879	68/57

Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud

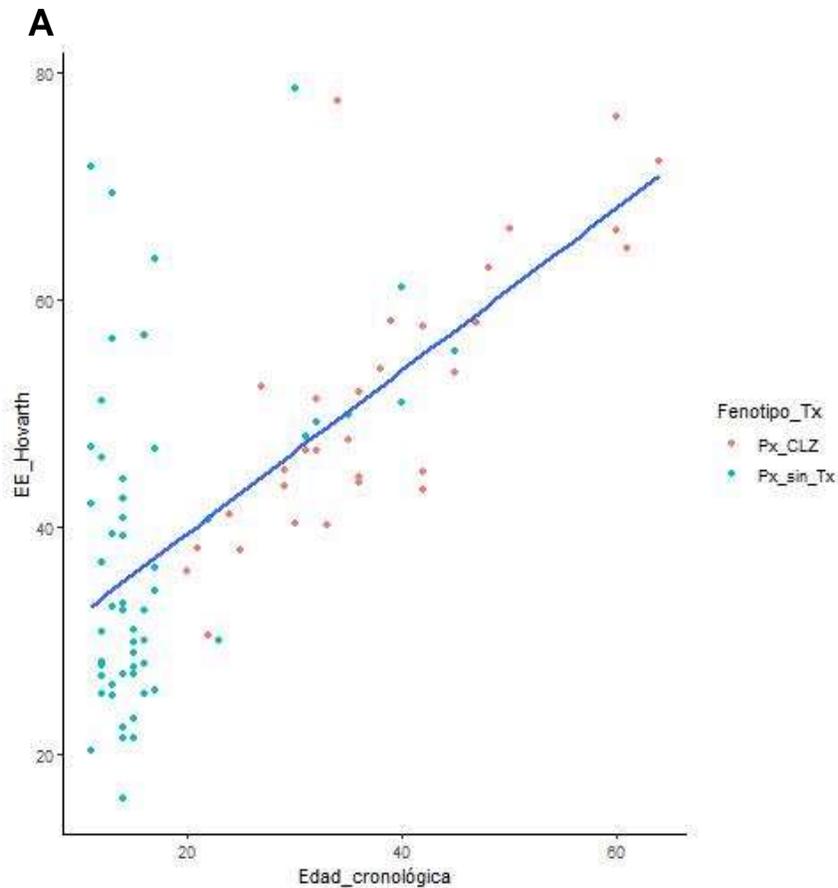
Replicación de DNA	<i>DNA2, FEN1, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM7, PCNA, POLA2, POLD2.</i>	7.7720e-3	1.3798	36/30
Proteasoma	<i>ADRM1, POMP, PSMA1, PSMA3, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB10.</i>	4.6841e-3	1.3614	45/37
Adhesión focal	<i>ACTB, ACTG1, ACTN1, ACTN4, AKT1, AKT2, ARHGAP5, BAD, BCAR1, BCL2.</i>	3.7843e-8	1.3229	199/159
Síntesis y secreción de aldosterona	<i>ADCY1-ADCY9, ATF1, ATF2, ATF4, ATF6B, ATP1A1, ATP1A3, ATP1B1, ATP1B2, ATP1B3.</i>	2.9567e-4	1.3108	96/76
Adicción a la morfina	<i>DCY1-DCY9, ADORA1, ARRB1, ARRB2, CACNA1A, CACNA1B, GABBR1, GABBR2, GABRA1, GABRA2.</i>	4.5076e-4	1.3100	91/72
Apoptosis	<i>APAF1, BAK1, BAX, BBC3, BCL2, BCL2L1, BCL2L11, BID, BIRC2, BIRC3.</i>	4.6378e-2	1.3045	33/26
Autofagia	<i>AKT1, AKT1S1, AKT2, ATG10, ATG12, ATG16L1, ATG16L2, ATG2A, ATG2B, ATG3.</i>	3.2120e-4	1.2677	128/98
Ciclo de vesículas sinápticas	<i>AP2A1, AP2A2, AP2B1, AP2M1, AP2S1, ATP6V0A1, ATP6V0B, ATP6V0D1, ATP6V0E1, ATP6V0E2.</i>	1.5346e-2	1.2615	63/48
Vía de señalización ras	<i>ABL1, ABL2, AKT1, AKT2, ANGPT1, ANGPT4, ARF6, BAD, BCL2L1, BDNF.</i>	1.1013e-4	1.2133	232/170

Tabla 6. Enriquecimiento de vías de los sitios hipermetilados con metilación diferencial.

Vía	Genes	FDR	Proporción de enriquecimiento	No. de genes esperados/ encontrados
Trasportadores ABC	<i>ABCA1, ABCA12, ABCA2, ABCA3, ABCA7, ABCB8, ABCB9, ABCC1, ABCC12, ABCC2</i>	1.5698e-4	3.4022	44/19
Endocitosis	<i>AGAP1, AP2A1, AP2A2, AP2B1, AP2M1, ARAP1, ARAP3, ARPC1B, ASAP1, ASAP2</i>	1.6104e-4	1.8728	244/58

8.5 La edad epigenética de las muestras analizadas

Se determinó la edad epigenética y se correlacionó con la edad cronológica, mostrando una gran dispersión en ambos grupos de estudio. La edad cronológica se correlacionó positivamente con la edad epigenética usando los relojes de: Hannum ($r^2 = 0.679$, $p = 4.96e^{-13}$), Horvath ($r^2 = 0.66$, $p = 2.85e^{-12}$) y PhenoAge ($r^2 = 0.66$, $p\text{-valor} = 2,26e^{-12}$) (figura 6).



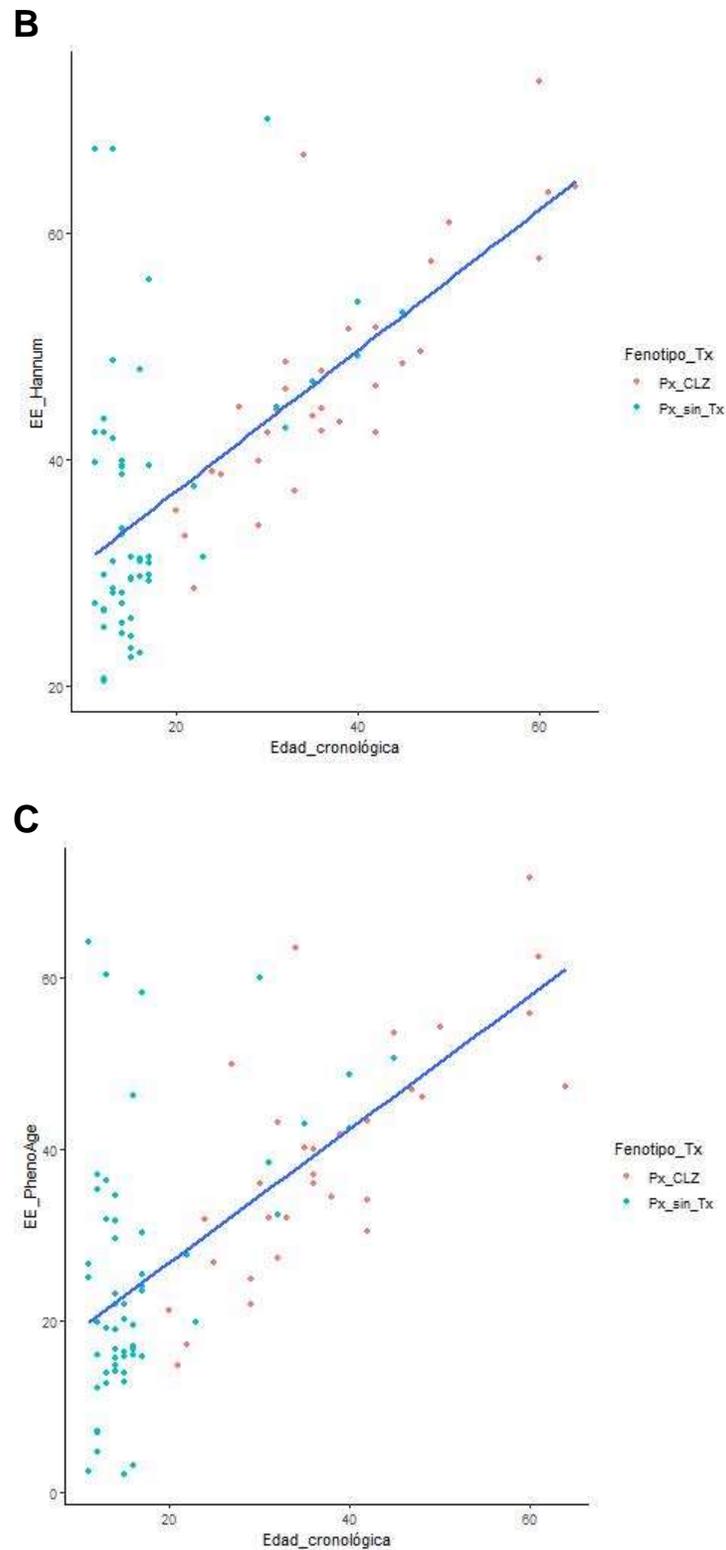
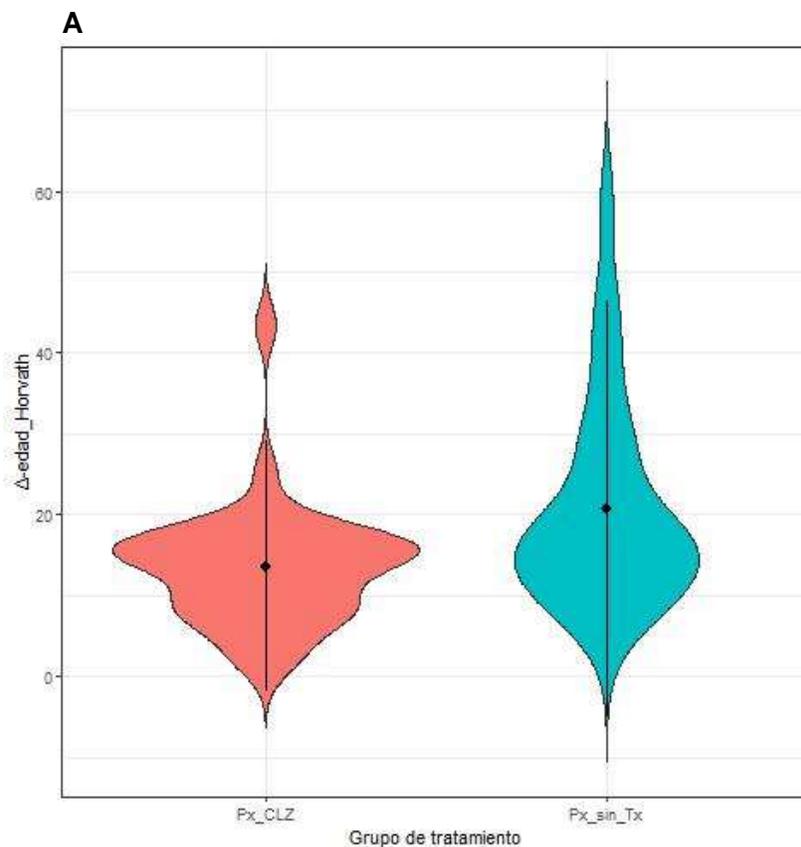


Figura 6. Dispersión de la edad cronológica y su correlación con la edad epigenética. Edades epigenéticas calculadas con los relojes de: **A)** Horvath. **B)** Hannum. **C)** PhenoAge. **EE**=Edad epigenética, **Px_CLZ**=Pacientes bajo tratamiento con CLZ, **Px_sin_Tx**= Pacientes sin tratamiento psicofarmacológico previo.

El análisis de la delta de edad (Δ -edad), estimando la diferencia entre la edad epigenética y la edad cronológica, mostró diferencias significativas entre los pacientes tratados con CLZ vs. los pacientes sin tratamiento con los tres relojes epigenéticos evaluados, obteniendo los siguientes resultados: Horvath ($t = -3.23$, $p = 0.0018$), Hannum ($t = -4.83$, $p = 6.074e^{-06}$) y PhenoAge ($t = -2.72$, $p = 0.008$). El reloj de Hannum mostró el valor más significativo estadísticamente. El promedio de la Δ edad en los pacientes tratados con CLZ fue de 13.64, 9.65 y 1.54 años para los relojes Horvath, Hannum y PhenoAge, respectivamente. En pacientes sin tratamiento previo, los promedios de la Δ edad fueron de 20.77, 18.84 y 8.15 años para cada uno de los tres relojes con valores de $p = 0.002$, $6.074 e^{-06}$ y 0.008 , respectivamente (figura 7). En los tres casos, los pacientes tratados con CLZ mostraron un Δ edad menor que los pacientes sin tratamiento psicofarmacológico, indicando que, de alguna manera la CLZ influye en el metiloma del DNA y en consecuencia modula la edad epigenética de los pacientes que están bajo tratamiento con este fármaco.



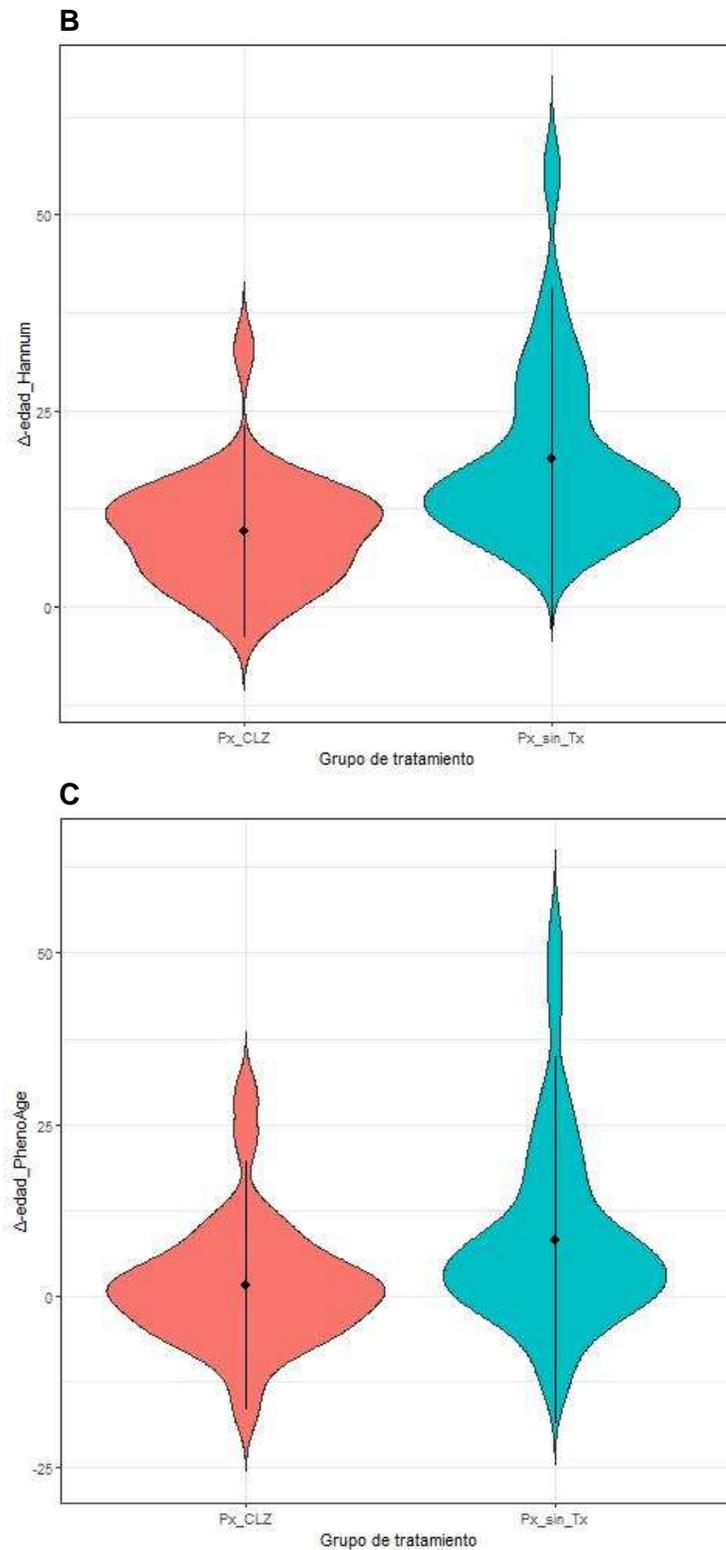
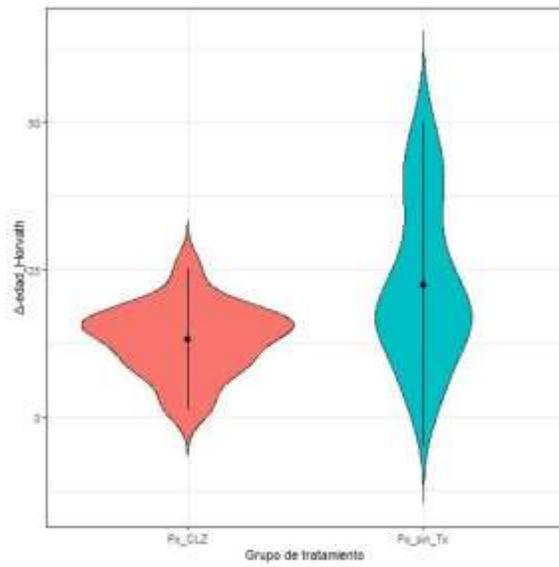


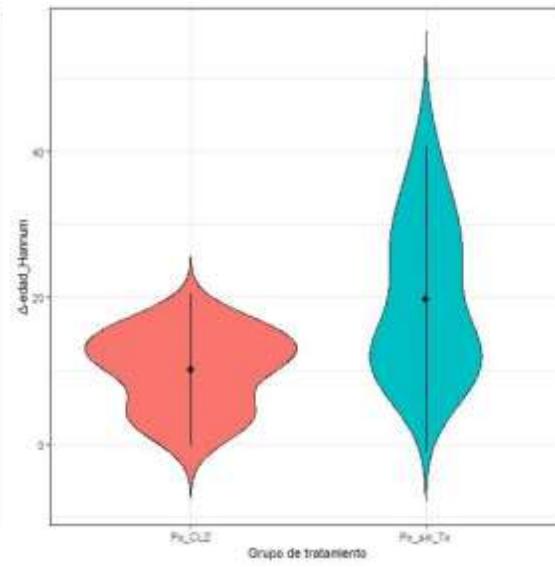
Figura 7. Gráficos de violín de la Δ edad de pacientes tratados con CLZ y sin tratamiento psicofarmacológico previo. Se muestra la comparación de la Δ edad entre pacientes tratados con CLZ y pacientes sin tratamiento previo para los relojes de: **A)** Horvath, **B)** Hannum y **C)** PhenoAge.

La comparación de los pacientes tratados con CLZ frente a los pacientes sin tratamiento previo estratificados por sexo mostró diferencias significativas para los pacientes masculinos tratados con CLZ con Δ edad promedio de 13.15, 10.07 y 1.60 años para los relojes de Horvath ($p= 0.0376$), Hannum ($p= 0.0073$) y PhenoAge ($p= 0.0370$) (figura 8A-8C). Los promedios de la Δ edad en pacientes femeninas tratadas con CLZ fue de 14.30, 9.06 y 1.47 años para los relojes de Horvath, Hannum y PhenoAge, respectivamente, y solo se encontraron diferencias significativas para el reloj de Hannum ($t = -3.225$, $p = 0.0035$) (figura 8D-8F).

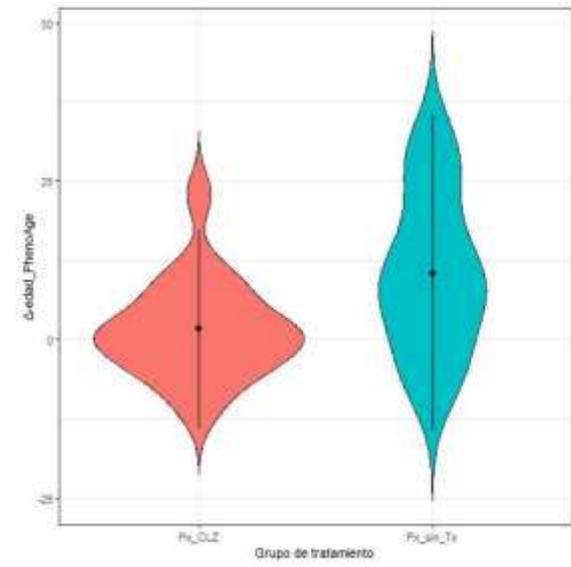
A



B



C



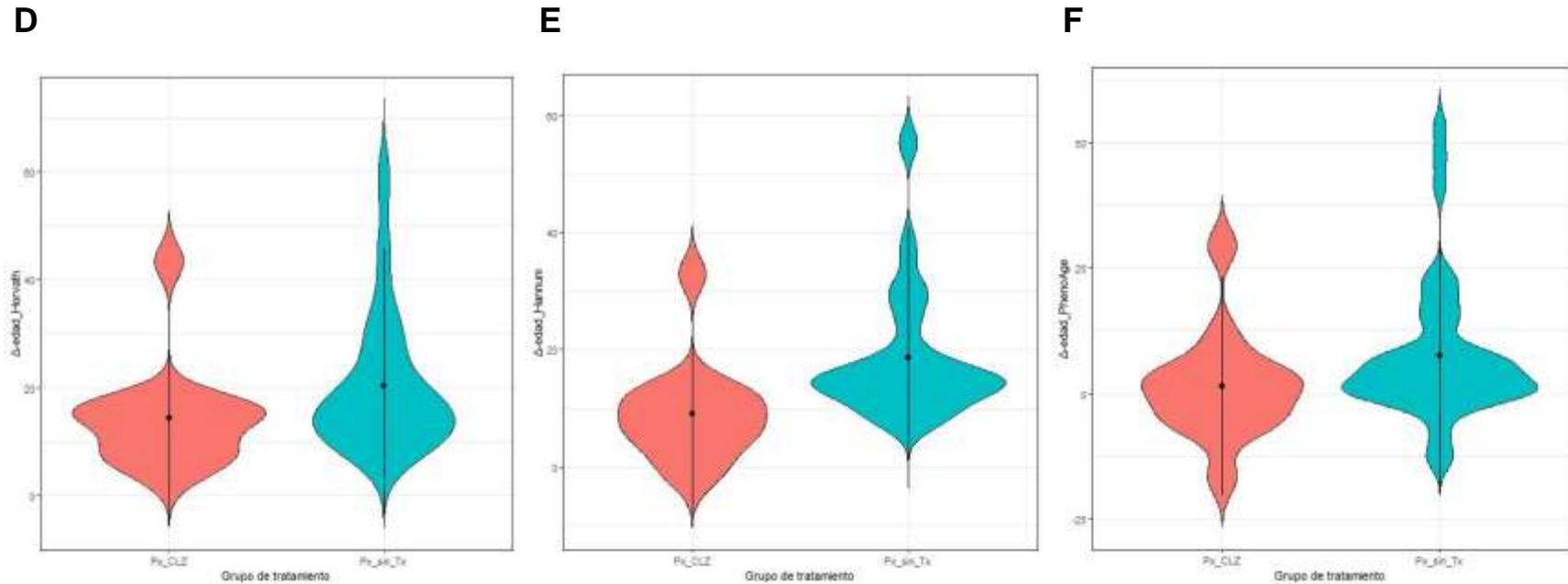


Figura 8. Gráficos de violín para Δ edad por género entre pacientes tratados con CLZ y pacientes sin tratamiento previo. Se muestran la comparación de la Δ edad estratificada por sexo entre los pacientes tratados con CLZ y los pacientes sin tratamiento previo. Δ edad de pacientes masculinos calculada con los relojes: **A)** Horvath, **B)** Hannum, **C)** PhenoAge. **D- F)** Δ edad de pacientes femeninos estimada con los relojes de Horvath, Hannum y PhenoAge, respectivamente.

8.6 Comparación de la diferencia de edad o Δ edad en pacientes maduros y jóvenes tratados con CLZ

Debido a la dispersión en los datos de la edad cronológica de los pacientes tratados con CLZ y a su tiempo de tratamiento con un antipsicótico, que podrían ser variables confusoras, se formaron subgrupos de pacientes tomando en cuenta los valores promedio de la edad 37.74 años y del tiempo medio de tratamiento 9.22 años. Este análisis permitió observar diferencias significativas en la Δ edad para los relojes de Horvath y Hanum entre pacientes por años de tratamiento con CLZ y edad cronológica (pacientes <9 años de tratamiento con CLZ vs. pacientes con >9 años de tratamiento con CLZ y pacientes jóvenes vs. pacientes maduros, respectivamente). Además, se encontraron otras diferencias con el reloj de Hannum en las siguientes comparaciones: Pacientes maduros con >9 años de tratamiento con CLZ vs. pacientes jóvenes con >9 maduros de tratamiento con CLZ ($p = 0.0021$); pacientes maduros con >9 años con CLZ vs. pacientes jóvenes con <9 años de tratamiento ($p = 0.0263$); y pacientes maduros con <9 años de tratamiento vs. pacientes jóvenes con >9 años de tratamiento ($p = 0.0236$) (figura 9A). En cuanto al reloj de Horvath, solo observamos diferencias entre el grupo de pacientes maduros y jóvenes, ambos con tratamiento prolongado con CLZ (>9 años) ($p = 0.019$) (figura 9B).

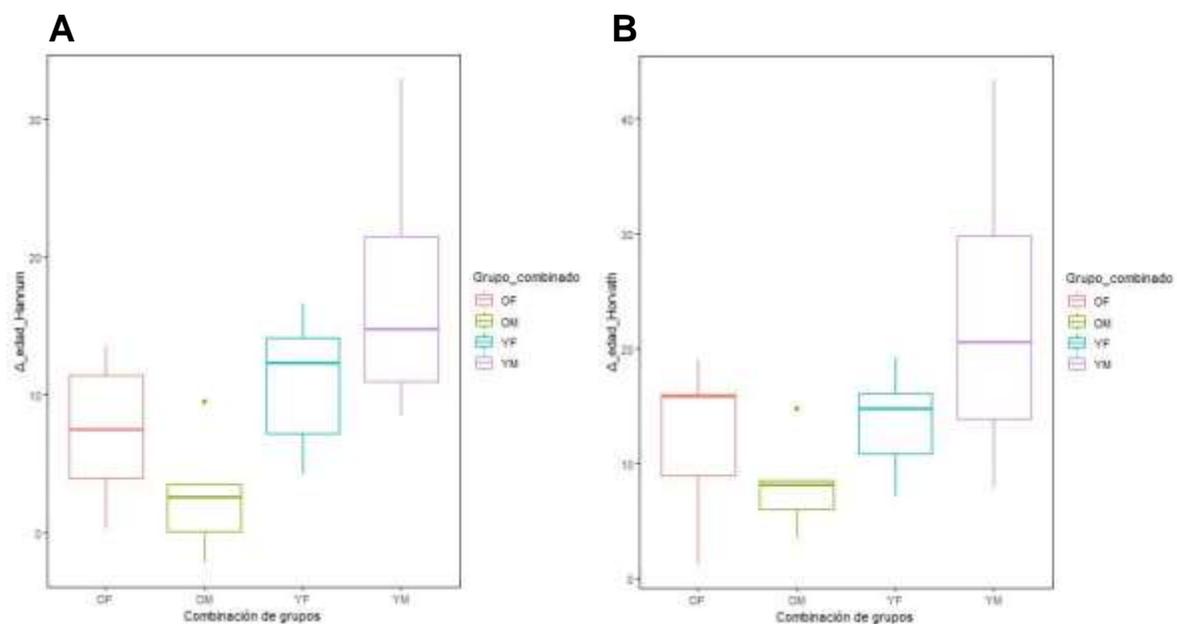


Figura 9. Diagrama de cajas para la comparación de la Δ edad de los pacientes de acuerdo con la edad cronológica y el periodo de tratamiento con CLZ. Se muestra la comparación de la Δ edad utilizando reloj de **A) Hannum y **B)** Horvath en los cuatro subgrupos generados de acuerdo con los promedios de edad cronológica y años de tratamiento CLZ. Se observan diferencias entre pacientes**

jóvenes con pocos o muchos años de tratamiento vs pacientes maduros con muchos años de tratamiento. Los cuatro grupos analizados fueron: pacientes jóvenes con <9 años de tratamiento con CLZ (YF); pacientes jóvenes con >9 años de tratamiento (YM); pacientes maduros con <9 años de tratamiento (OF) y pacientes maduros con >9 años de tratamiento (OM). El asterisco (*) denota diferencias significativas.

8.7 Interacciones proteína-proteína

Después del enriquecimiento de vías con los genes que se identificaron en sitios con metilación diferencial, se realizó un subenriquecimiento exclusivamente con las proteínas codificadas por los genes que intervienen en la vía de la longevidad para identificar su posible interacción con proteínas de vías biológicas importantes. Se identificó que estas proteínas interactúan con las vías de señalización de AMPK (proteína cinasa activada por adenosín monofosfato) y vías de señalización de la insulina (figura 10).

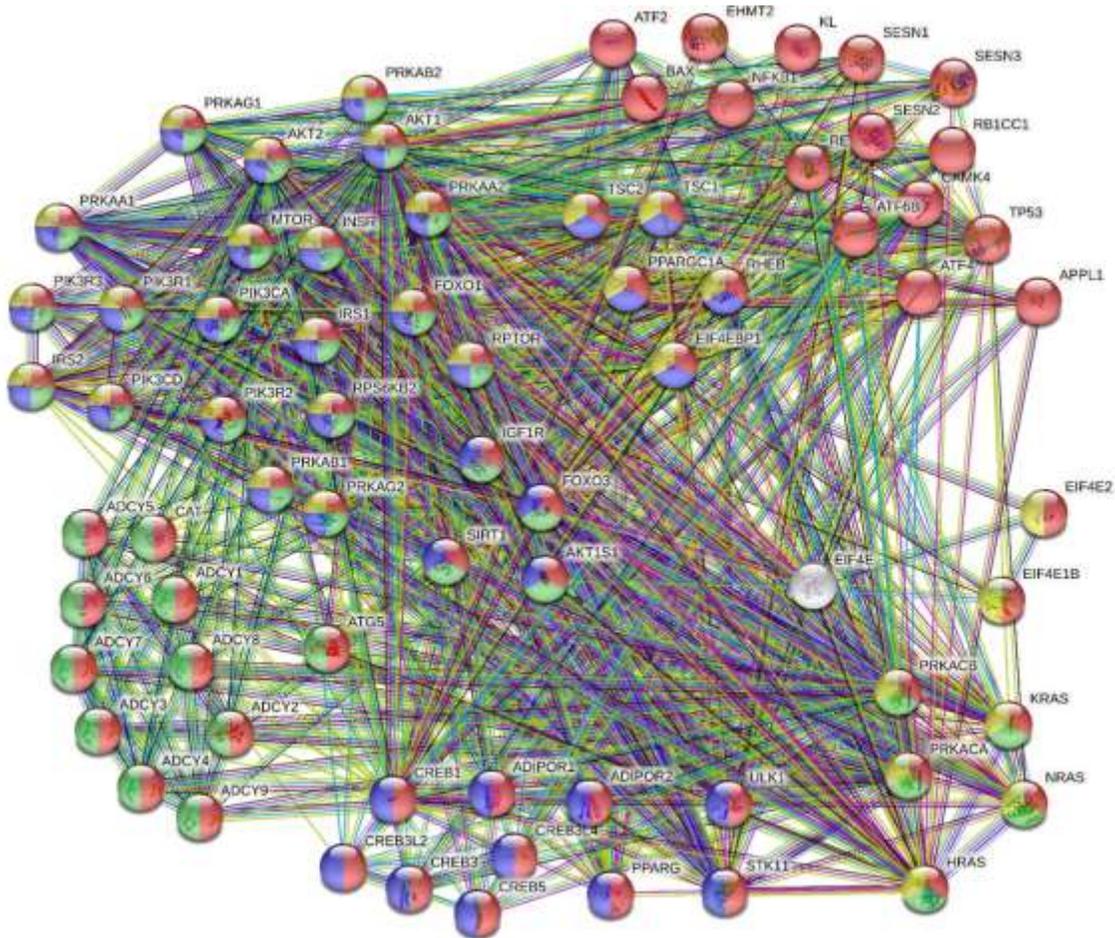


Figura 10. Gráfico de interacciones proteína-proteína entre los productos génicos de la vía reguladora de la longevidad. Los nodos se colorean según el análisis de la herramienta de búsqueda para la recuperación de genes / proteínas que interactúan (STRING). Las proteínas implicadas en la vía reguladora de la longevidad se destacan en colores rojo y verde (vías KEGG:

hsa04211 y hsa04213, respectivamente); mientras que las proteínas de la vía de señalización de AMPK (hsa04152) y las proteínas de la vía de señalización de la insulina (hsa04910) se muestran en azul y amarillo, respectivamente.

8.8 Validación de la metilación identificada por microarreglos

El análisis de priorización permitió seleccionar a los genes *MICA*, *MAPK4* y *FOXO3* que participan en la vía de la longevidad. Esta ruta fue identificada en el enriquecimiento de vías de los datos obtenidos con el microarreglo; y en la revisión bibliográfica, *MICA* está involucrado en la inducción de agranulocitosis por CLZ en el análisis FUMA, *MAPK4* se ha relacionado con el desarrollo de ESQ y *FOXO3* se ha analizado por mostrar un efecto protector de CLZ contra la muerte celular inducida por corticosterona mediante la modulación de la actividad de la vía PI3K/Akt/FoxO3a. Los genes *FOXO* están involucrados en el metabolismo energético, el estrés oxidativo, la proteostasis, la apoptosis, la regulación del ciclo celular, los procesos metabólicos, la inmunidad, la inflamación y el mantenimiento de las células madre (el cual se relaciona con longevidad), además de asociarse con susceptibilidad a TB.

En la tabla 7 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la MS-PCR de cada gen.

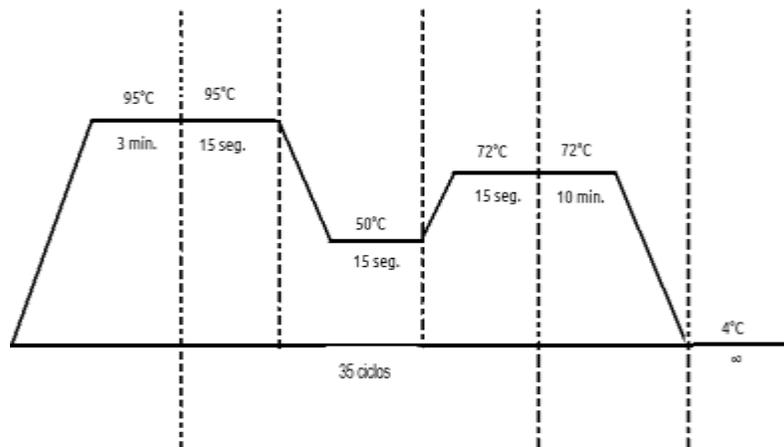
Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos para validación de metilación diferencial, por MS-PCR.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido
<i>MICA</i>	Metilado 5' TTGTTAGTAACGTTGTGCGC 3'	Metilado 5' CAAAAAATAAAAAACACGCGA 3'
	No metilado 5' TTATTGTTAGTAATGTTGTGTGT 3'	No metilado 5' ACCCAAAAAATAAAAAACACACAA 3'
<i>MAPK4</i>	Metilado 5' CGTTTCGAGGTAGTGTTTTC 3'	Metilado 5' ATCGCTAATCGATACCCTAAA 3'
	No metilado 5' TGTTTTGAGGTAGTGTTTTT 3'	No metilado 5' ATCACTAATCAATACCCTAAA 3'
<i>FOXO3</i>	Metilado 5' ATAGTAGCGGGAGTTCGTC 3'	Metilado 5' TATATAAACTCGCGCGCG 3'
	No metilado	No metilado

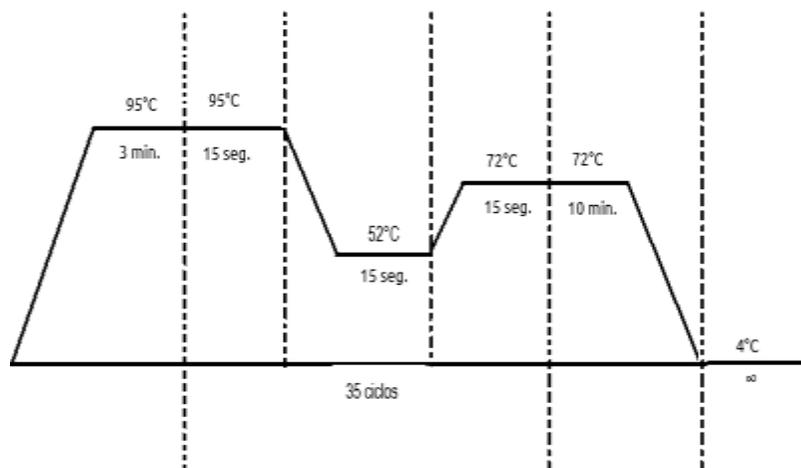
	5' GGGATAGTAGTGGGAGTTTGT 3'	5' TATATAAACTCACACACACCT 3'
--	--------------------------------	-----------------------------

Se llevaron a cabo pruebas con cada par de oligonucleótidos de acuerdo con las condiciones de reacción de la figura 11.

A)



B)



C)

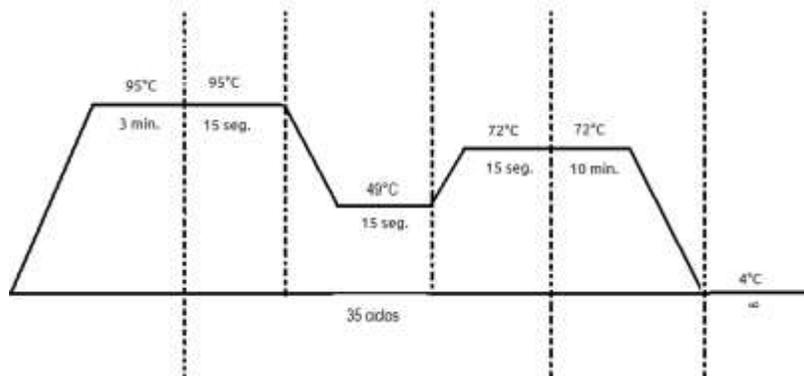


Figura 11. Grafica de las condiciones de amplificación de MS-PCR. Representación de las condiciones de tiempos y temperaturas para la MS-PCR de los genes: **A) *MICA***, **B) *FOXO3*** y **C) *MAPK4***.

Observamos una variación en la T_m entre los dos pares de oligonucleótidos empleados para la correcta amplificación de los productos de *MICA* (figura 12); ya que al cambiar la T_m se puede diferenciar entre el amplicón de DNA metilado vs. no metilado, sin embargo, los amplicones para DNA metilado se pierden; esto podría solucionarse realizando PCR por separado a distintas T_m .

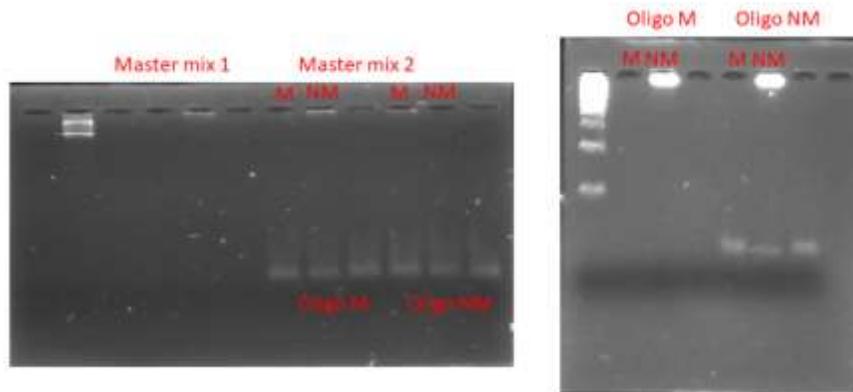


Figura 12. Resultado de los cambios en la reacción de MS-PCR para el gen *MICA*. Se muestran los amplicones resultantes de la MS-PCR para la identificación de muestras metiladas o no metiladas según el par de oligonucleótidos con el que se amplifique. *Master mix*: Mezcla de reacción que incluye los componentes necesarios para la PCR, excepto oligonucleótidos y DNA. Oligo M: Oligonucleótidos para amplificación de DNA metilado. Oligo NM: Oligonucleótidos para amplificación de DNA no metilado. M: DNA metilado. NM: DNA no metilado.

Se estandarizaron las condiciones para la MS-PCR de los tres genes propuestos. En la figura 13 se observa el producto de amplificación de *MAPK4* y *FOXO3*.

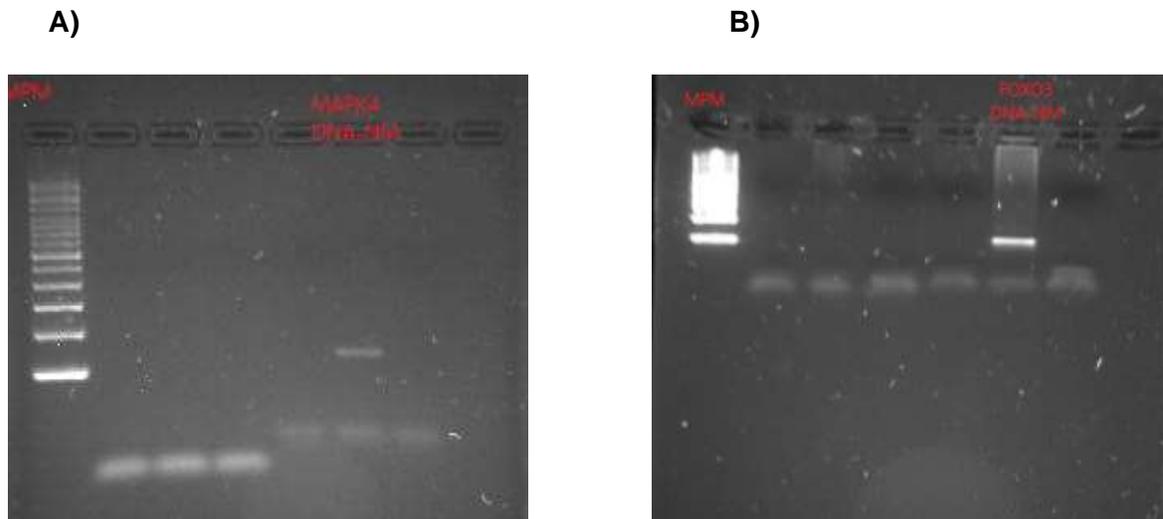


Figura 13. MS-PCR de los genes A) *MAPK4* y B) *FOXO3*. Imagen representativa de la estandarización de MS-PCR de los productos de convertidos con bisulfito de sodio. Se observa la banda esperada en las muestras de DNA no metilado (DNA-NM). MPM, marcador de pesos moleculares

Cabe mencionar, que queda pendiente como trabajo en el laboratorio, validar con esta metodología la metilación diferencial observada en los microarreglos para los tres genes en paciente y controles.

8.9 La longitud telomérica

Las pruebas de normalidad mostraron que los datos tuvieron una distribución no paramétrica ($w=0.56305$, $p=1.973e-11$). La comparación de la LT entre pacientes y controles mostró diferencias significativas $W = 639$, $p = 0.0037$ (figura 14).

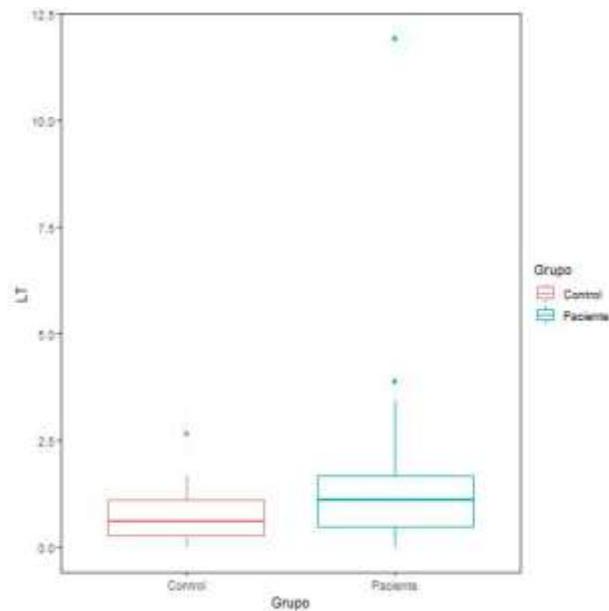


Figura 14. Comparación de las medias de la cuantificación relativa de la LT entre pacientes y controles. Se muestra la LT de pacientes (verde) con TPP tratados con CLZ mayor que la de controles (rojo) sanos, pareados por edad y sexo.

8.10 Número de copias del DNA mitocondrial

Se demostró un mayor contenido de mtDNA-CN en pacientes con TPP tratados con CLZ que en los controles sanos y pareados (figura 15). La comparación de los valores promedio de mtDNA-CN con la prueba U de Mann-Whitney mostró $W= 582$ y $p= 0.002076$.

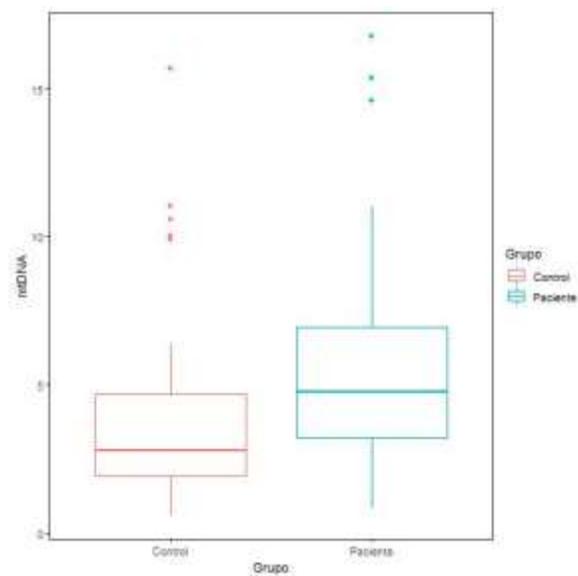


Figura 15. Comparación de la cuantificación relativa de la mtDNA-CN entre pacientes con TPP tratados con CLZ vs. controles sanos. El gráfico de cajas evidencia un menor mtDNA-CN en controles (rojo) pareados por edad y sexo vs. los pacientes (verde).

Los resultados del análisis de correlación de ambos marcadores de envejecimiento en los pacientes y controles (figura 16) no mostró diferencias ($r=-0.1599$, $p=0.3588$).

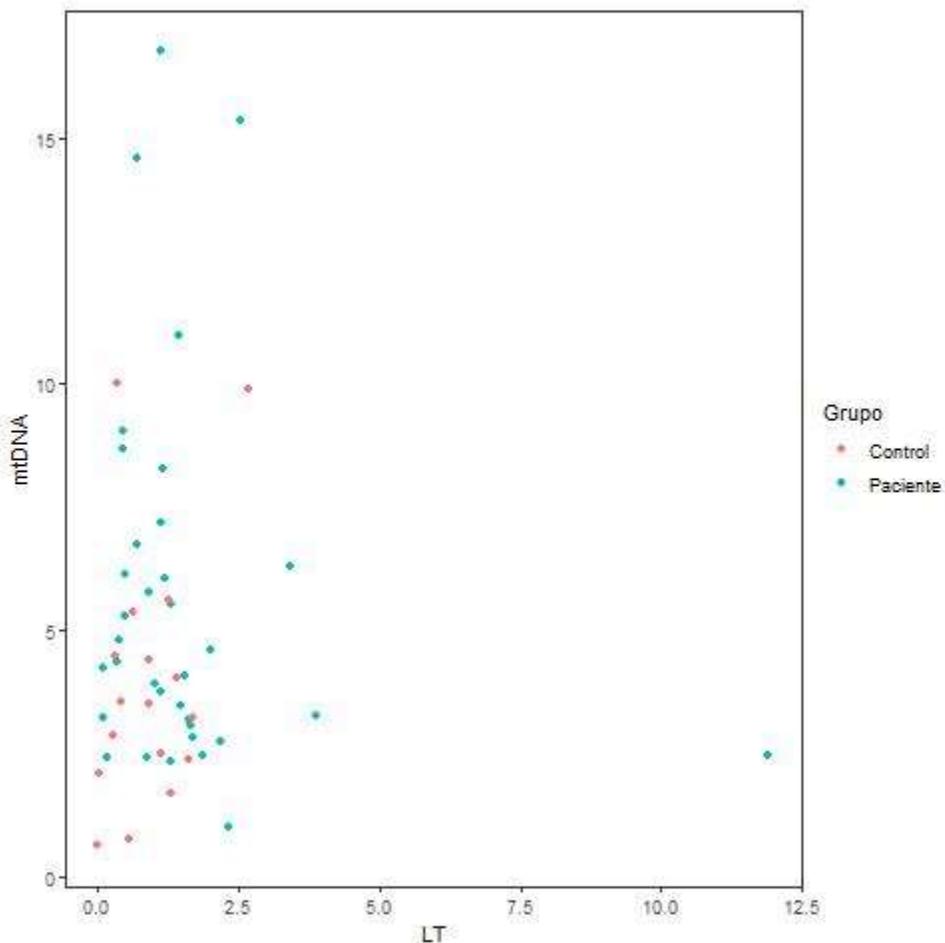


Figura 16. Correlación entre la LT y el mtDNA-CN en pacientes con TPP y controles sanos. Se muestra el gráfico con una correlación negativa entre la LT y el mtDNA-CN entre pacientes (verde) y controles (rojo).

9. DISCUSIÓN

Este estudio se centró en analizar la metilación diferencial en una población latinoamericana, la mexicana, entre pacientes tratados con CLZ con psicosis refractaria, pacientes con trastornos psiquiátricos sin tratamiento previo con psicofármacos y sujetos aparentemente sanos sin antecedentes de enfermedades psiquiátricas o neurodegenerativas. Existen diversos reportes de análisis de metiloma del DNA en

pacientes con ESQ tratados con CLZ en poblaciones europeas (76,77) y asiáticas (36,78). Nuestros hallazgos concuerdan con trabajos previos donde se encuentra una mayor proporción de sitios hipometilados en pacientes con ESQ refractaria tratados con CLZ (79) y un incremento en la hipometilación global del DNA en leucocitos de pacientes con ESQ que recibieron CLZ (80). Estudios adicionales han sugerido que la CLZ induce la desmetilación del DNA a nivel de genes específicos; por ejemplo, la evidencia sugiere que la CLZ puede atenuar la desregulación de la transmisión GABAérgica y glutamatérgica al reducir la hipermetilación de los promotores de estos genes (81,82).

Por otro lado, un estudio previo observó el mismo efecto de la CLZ en la reducción de la edad epigenética en pacientes masculinos con ESQ (83). Aunque estos autores estudiaron una muestra más grande de pacientes con ESQ, incluyeron muy pocos usuarios de CLZ y no realizaron un análisis de metilación diferencial. No obstante, sus hallazgos anteriores son consistentes con los nuestros, puesto que estos investigadores sugirieron que el tratamiento con CLZ podría reducir el envejecimiento epigenético e impactar directamente en la mortalidad de las personas tratadas con este antipsicótico (83).

Además, una de las vías que se encontró hipometilada fue la vía de señalización de estrógenos, incluyendo el gen que codifica el receptor 1 de estrógenos (*ESR1*), el cual participa en el metabolismo de los estrógenos y las diferencias en la frecuencia de algunas de sus variantes genéticas han sido asociadas con la longevidad en humanos (84,85). Los niveles de metilación del DNA en este gen podrían explicar la diferencia en la reducción de la edad epigenética solo en los hombres. Los niveles de estrógeno en un modelo de ratón tratado con 17-alfa estradiol afectaron los parámetros metabólicos y retrasaron el envejecimiento en ratones macho (86,87). Si la CLZ induce la hipometilación del DNA, ello aumentaría la expresión del gen *ESR1* y la sensibilidad a los estrógenos, lo que podría encajar en una hipótesis detrás de la reducción significativa de la edad epigenética observada en nuestro estudio. Esto está en concordancia con los estudios epidemiológicos y un meta-análisis de Vermeulen et al. 2018 (88), quienes reportaron que el tratamiento a largo plazo con CLZ se asocia con una mortalidad aproximadamente un 40 % menor por cualquier causa en comparación con otros antipsicóticos (89–92).

Los resultados también demostraron un enriquecimiento de las enzimas adenilil-ciclasas unidas a la membrana (también llamadas adenilato ciclasas, ADCY) en esta vía. Contradictoriamente, la hipometilación de los genes ADCYs tendría una acción similar a la

reportada cuando estos genes son inhibidos. Por ejemplo, el ratón *knockout* para *Adcy5* vive más tiempo y se utiliza como un modelo de longevidad (93–97). En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que la regulación de la vía de la longevidad por la acción de la CLZ a largo plazo puede promover cambios epigenéticos que deben explorarse más a fondo. Curiosamente, otro grupo de genes encontrados en el análisis de la red de interacción proteína-proteína está relacionado con las proteínas quinasas activadas por AMP (AMPK). La activación de esta vía también se ha asociado con la longevidad y el retraso del envejecimiento (98–102).

La CLZ muestra beneficios únicos para mejorar los síntomas en pacientes con psicosis resistente al tratamiento, para reducir el suicidio y para mejorar la longevidad (103). Esta última característica se ha observado en algunos estudios epidemiológicos (91,104–106), y en un estudio reciente utilizando clasificadores de edad a transcriptomas inducidos por fármacos que identificaron varios fármacos geroprotectores, incluido CLZ (107). Por lo tanto, a pesar de las reacciones adversas letales asociadas con la CLZ, esta molécula puede tener efectos duraderos que deben investigarse más a fondo.

Con relación a la LT, el resultado de una LT mayor en pacientes tratados con CLZ vs. controles sanos es congruente con los resultados de un retraso en el envejecimiento biológico; sin embargo, falta explicar esto en un contexto biológico. Los resultados de LT en TPP en la literatura son controversiales y se han relacionado con tipo de antipsicótico o respuesta. Por ejemplo, el estudio de Polho, et al. 2022 se observó que el tratamiento de leucocitos con antipsicóticos aripiprazol y/o haloperidol elonga o mantiene la LT (108); sin embargo, estos son fármacos antipsicóticos con un mecanismo de acción distinto a la CLZ. En otro reporte observaron una LT menor en pacientes bajo tratamiento con olanzapina, antipsicótico de segunda generación con alto riesgo de síndrome metabólico (109). La LT mayor en pacientes tratados con CLZ podría sugerir un efecto protector del antipsicótico ante el envejecimiento acelerado de pacientes con trastornos psicóticos.

De igual forma, se identificó un mtDNA-CN mayor en los pacientes tratados con CLZ vs. controles sanos, este es un resultado controversial, ya que en la literatura existen estudios como el de Kumar y colaboradores que identificaron menor mtDNA-CN en pacientes tratados con CLZ o risperidona (110). Una posible explicación a esto sería el diseño de los estudios para análisis de estos marcadores de envejecimiento, metodología, inclusión de variables confusoras adicionales al tratamiento antipsicótico que modulan LT y mtDNA-CN,

como son: Estilo de vida, co-tratamientos, edad de inicio, y respuesta al tratamiento entre otros. Estos trabajos plantean a CLZ como un epifármaco potencial por lo que es necesario continuar investigando si la CLZ modula el mtDNA-CN o LT mediante un estudio longitudinal, e identificar los mecanismos implicados en ello para proponer intervenciones terapéuticas que mejoren la calidad de vida de los pacientes con TPP.

10. CONCLUSIONES

- Se determinó que los pacientes tratados con CLZ presentaron una menor Δ -edad vs. los pacientes sin tratamiento psicofarmacológico previo.
- Los pacientes tratados con CLZ presentaron una LT mayor comparado con controles sanos.
- Los pacientes tratados con CLZ presentaron un mayor mtDNA-CN comparado con los controles sanos.
- Existen diferencias en el Δ edad de acuerdo con el periodo de tratamiento con CLZ incluso si los pacientes son maduros o jóvenes.
- Con los resultados obtenidos en relación con la metilación del DNA, la LT y el mtDNA-CN, se sugiere que el tratamiento a largo plazo con CLZ podría ejercer un efecto geroprotector en pacientes con trastornos psicóticos primarios.

11. PERSPECTIVAS

- Confirmar el efecto de la CLZ en la edad epigenética en pacientes con TPP en una muestra mayor de pacientes.
- Analizar si los datos de metilación obtenidos se traducen en disminución de la expresión de los genes seleccionados.

- Confirmar el efecto geroprotector de la CLZ en la LT y mtDNA-CN y metilación del DNA con el fin de poder analizar si la prescripción de este fármaco podría representar mayores beneficios para los pacientes con TPP.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. What is Mental Illness? [Internet]. [citado 30 de enero de 2024]. Disponible en: <https://www.psychiatry.org:443/patients-families/what-is-mental-illness>
2. WHO MiNDbank - IESM-OMS Informe Sobre el Sistema de Salud Mental en México (WHO-AIMS Report on Mental Health System in Mexico) [Internet]. [citado 30 de enero de 2024]. Disponible en: <https://extranet.who.int/mindbank/item/448>
3. Mental disorders [Internet]. [citado 24 de enero de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>
4. Botero-Franco D, Palacio-Ortíz JD, Arroyave-Sierra P, Piñeros-Ortíz S. Implicaciones clínicas de los cambios del DSM-5 en psiquiatría infantil. Fortalezas y debilidades de los cambios. Rev Colomb Psiquiatr. 1 de julio de 2016;45(3):201-13.
5. Administration SA and MHS. Table 3.20, DSM-IV to DSM-5 Psychotic Disorders [Internet]. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (US); 2016 [citado 20 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519704/table/ch3.t20/>
6. Maj M, van Os J, De Hert M, Gaebel W, Galderisi S, Green MF, et al. The clinical characterization of the patient with primary psychosis aimed at personalization of management. World Psychiatry. febrero de 2021;20(1):4-33.
7. Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [citado 21 de junio de 2024]. Trastorno psicótico debido a otra afección médica - Trastornos psiquiátricos. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-psiquiátricos/esquizofrenia-y-trastornos-relacionados/trastorno-psicótico-debido-a-otra-afección-médica>

8. Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [citado 21 de junio de 2024]. Trastorno psicótico inducido por sustancias/medicación - Trastornos psiquiátricos. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-psiquiátricos/esquizofrenia-y-trastornos-relacionados/trastorno-psicótico-inducido-por-sustancias-medicación>
9. Lieberman JA, First MB. Psychotic Disorders. *N Engl J Med*. 19 de julio de 2018;379(3):270-80.
10. Sheffield JM, Rogers BP, Blackford JU, Heckers S, Woodward ND. Accelerated Aging of Functional Brain Networks Supporting Cognitive Function in Psychotic Disorders. *Biol Psychiatry*. 1 de agosto de 2019;86(3):240-8.
11. Heckers S, Barch DM, Bustillo J, Gaebel W, Gur R, Malaspina D, et al. Structure of the psychotic disorders classification in DSM-5. *Schizophr Res*. octubre de 2013;150(1):11-4.
12. World Health Organizatio. Schizophrenia. [citado 16 de julio de 2024]. Schizophrenia. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>
13. Johnson K, Weldon AJ, Burmeister MA. Differential effects of cannabis constituents on schizophrenia-related psychosis: a rationale for incorporating cannabidiol into a schizophrenia therapeutic regimen. *Front Psychiatry*. 2024;15:1386263.
14. Jauhar S, Johnstone M, McKenna PJ. Schizophrenia. *Lancet Lond Engl*. 29 de enero de 2022;399(10323):473-86.
15. Carvalho Andre F., Firth Joseph, Vieta Eduard. Bipolar Disorder. *N Engl J Med*. 2 de julio de 2020;383(1):58-66.
16. Pérez-Ramos A, Romero-López-Alberca C, Hidalgo-Figueroa M, Berrocoso E, Pérez-Revuelta JI. A systematic review of the biomarkers associated with cognition and mood state in bipolar disorder. *Int J Bipolar Disord*. 17 de mayo de 2024;12(1):18.
17. Ironside ML, Johnson SL, Carver CS. Identity in bipolar disorder: Self-worth and achievement. *J Pers*. febrero de 2020;88(1):45-58.

18. Kato T. Current understanding of bipolar disorder: Toward integration of biological basis and treatment strategies. *Psychiatry Clin Neurosci*. septiembre de 2019;73(9):526-40.
19. Bipolar Disorder - National Institute of Mental Health (NIMH) [Internet]. [citado 27 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/bipolar-disorder>
20. Archibald L, Brunette MF, Wallin DJ, Green AI. Alcohol Use Disorder and Schizophrenia or Schizoaffective Disorder. *Alcohol Res Curr Rev*. 2019;40(1):arcr.v40.1.06.
21. Wy TJP, Saadabadi A. Schizoaffective Disorder. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 27 de junio de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541012/>
22. Feeney A, Umama-Agada E, Curley A, Anamdi C, Asghar M, Kelly BD. Voluntary and involuntary admissions with schizoaffective disorder: do they differ from schizophrenia? *Ir J Psychol Med*. junio de 2023;40(2):209-16.
23. Nucifora FC, Mihaljevic M, Lee BJ, Sawa A. Clozapine as a Model for Antipsychotic Development. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. julio de 2017;14(3):750-61.
24. Iglesias García C, Iglesias Alonso A, Bobes J. Concentrations in plasma clozapine levels in schizophrenic and schizoaffective patients. *Rev Psiquiatr Salud Ment*. 2017;10(4):192-6.
25. Curto M, Girardi N, Lionetto L, Ciavarella GM, Ferracuti S, Baldessarini RJ. Systematic Review of Clozapine Cardiotoxicity. *Curr Psychiatry Rep*. julio de 2016;18(7):68.
26. Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S. Biological Age Predictors. *EBioMedicine*. julio de 2017;21:29-36.
27. Gao X, Geng T, Jiang M, Huang N, Zheng Y, Belsky DW, et al. Accelerated biological aging and risk of depression and anxiety: evidence from 424,299 UK Biobank participants. *Nat Commun*. 20 de abril de 2023;14(1):2277.

28. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 19 de enero de 2023;186(2):243-78.
29. Khaltourina D, Matveyev Y, Alekseev A, Cortese F, Ioviță A. Aging Fits the Disease Criteria of the International Classification of Diseases. *Mech Ageing Dev*. julio de 2020;189:111230.
30. Fries GR, Bauer IE, Scaini G, Wu MJ, Kazimi IF, Valvassori SS, et al. Accelerated epigenetic aging and mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder. *Transl Psychiatry*. 11 de diciembre de 2017;7(12):1283.
31. Marioni RE, Harris SE, Shah S, McRae AF, von Zglinicki T, Martin-Ruiz C, et al. The epigenetic clock and telomere length are independently associated with chronological age and mortality. *Int J Epidemiol*. febrero de 2018;45(2):424-32.
32. McCaw BA, Stevenson TJ, Lancaster LT. Epigenetic Responses to Temperature and Climate. *Integr Comp Biol*. 16 de diciembre de 2020;60(6):1469-80.
33. Kabacik S, Lowe D, Fransen L, Leonard M, Ang SL, Whiteman C, et al. The relationship between epigenetic age and the hallmarks of aging in human cells. *Nat Aging*. junio de 2022;2(6):484-93.
34. Li A, Koch Z, Ideker T. Epigenetic aging: Biological age prediction and informing a mechanistic theory of aging. *J Intern Med*. noviembre de 2022;292(5):733-44.
35. Ceribelli A, Selmi C. Epigenetic Methods and Twin Studies. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1253:95-104.
36. Okazaki S, Otsuka I, Numata S, Horai T, Mouri K, Boku S, et al. Epigenetic clock analysis of blood samples from Japanese schizophrenia patients. *NPJ Schizophr*. 27 de febrero de 2019;5(1):4.
37. Vyas CM, Hazra A, Chang SC, Qiu W, Reynolds CF, Mischoulon D, et al. Pilot study of DNA methylation, molecular aging markers and measures of health and well-being in aging. *Transl Psychiatry*. 18 de marzo de 2019;9(1):118.

38. Ma SL, Tang NLS, Lam LCW. Association of gene expression and methylation of UQCRC1 to the predisposition of Alzheimer's disease in a Chinese population. *J Psychiatr Res.* mayo de 2016;76:143-7.
39. Hattori N, Liu YY, Ushijima T. DNA Methylation Analysis. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2023;2691:165-83.
40. Chen BH, Carty CL, Kimura M, Kark JD, Chen W, Li S, et al. Leukocyte telomere length, T cell composition and DNA methylation age. *Aging.* 20 de septiembre de 2017;9(9):1983-95.
41. Christiansen L, Lenart A, Tan Q, Vaupel JW, Aviv A, McGue M, et al. DNA methylation age is associated with mortality in a longitudinal Danish twin study. *Aging Cell.* febrero de 2016;15(1):149-54.
42. Duan R, Fu Q, Sun Y, Li Q. Epigenetic clock: A promising biomarker and practical tool in aging. *Ageing Res Rev.* noviembre de 2022;81:101743.
43. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115.
44. Otsuka I, Izumi T, Boku S, Kimura A, Zhang Y, Mouri K, et al. Aberrant telomere length and mitochondrial DNA copy number in suicide completers. *Sci Rep.* 9 de junio de 2017;7(1):3176.
45. Rivero-Segura NA, Bello-Chavolla OY, Barrera-Vázquez OS, Gutierrez-Robledo LM, Gomez-Verjan JC. Promising biomarkers of human aging: In search of a multi-omics panel to understand the aging process from a multidimensional perspective. *Ageing Res Rev.* 1 de diciembre de 2020;64:101164.
46. Ochi S, Roy B, Prall K, Shelton RC, Dwivedi Y. Strong associations of telomere length and mitochondrial copy number with suicidality and abuse history in adolescent depressed individuals. *Mol Psychiatry.* septiembre de 2023;28(9):3920-9.
47. Bojesen SE. Telomeres and human health. *J Intern Med.* noviembre de 2013;274(5):399-413.

48. Vasconcelos-Moreno MP, Fries GR, Gubert C, Dos Santos BTMQ, Fijtman A, Sartori J, et al. Telomere Length, Oxidative Stress, Inflammation and BDNF Levels in Siblings of Patients with Bipolar Disorder: Implications for Accelerated Cellular Aging. *Int J Neuropsychopharmacol*. 1 de junio de 2017;20(6):445-54.
49. Baek JH, Son H, Jeong YH, Park SW, Kim HJ. Chronological Aging Standard Curves of Telomere Length and Mitochondrial DNA Copy Number in Twelve Tissues of C57BL/6 Male Mouse. *Cells*. 15 de marzo de 2019;8(3):247.
50. Mengel-From J, Thinggaard M, Dalgård C, Kyvik KO, Christensen K, Christiansen L. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells declines with age and is associated with general health among elderly. *Hum Genet*. septiembre de 2014;133(9):1149-59.
51. Knez J, Winckelmans E, Plusquin M, Thijs L, Cauwenberghs N, Gu Y, et al. Correlates of Peripheral Blood Mitochondrial DNA Content in a General Population. *Am J Epidemiol*. 15 de enero de 2016;183(2):138-46.
52. Torrell H, Montaña E, Abasolo N, Roig B, Gaviria AM, Vilella E, et al. Mitochondrial DNA (mtDNA) in brain samples from patients with major psychiatric disorders: gene expression profiles, mtDNA content and presence of the mtDNA common deletion. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. marzo de 2013;162B(2):213-23.
53. Chestkov IV, Jestkova EM, Ershova ES, Golimbet VG, Lezheiko TV, Kolesina NY, et al. ROS-Induced DNA Damage Associates with Abundance of Mitochondrial DNA in White Blood Cells of the Untreated Schizophrenic Patients. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:8587475.
54. Bora E, Pantelis C. Meta-analysis of Cognitive Impairment in First-Episode Bipolar Disorder: Comparison With First-Episode Schizophrenia and Healthy Controls. *Schizophr Bull*. septiembre de 2015;41(5):1095-104.
55. Douaud G, Groves AR, Tamnes CK, Westlye LT, Duff EP, Engvig A, et al. A common brain network links development, aging, and vulnerability to disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 de diciembre de 2014;111(49):17648-53.

56. Chiapponi C, Piras F, Fagioli S, Piras F, Caltagirone C, Spalletta G. Age-related brain trajectories in schizophrenia: a systematic review of structural MRI studies. *Psychiatry Res.* 30 de noviembre de 2013;214(2):83-93.
57. Nenadić I, Dietzek M, Langbein K, Sauer H, Gaser C. BrainAGE score indicates accelerated brain aging in schizophrenia, but not bipolar disorder. *Psychiatry Res Neuroimaging.* 30 de agosto de 2017;266:86-9.
58. Harvey PD, Rosenthal JB. Cognitive and functional deficits in people with schizophrenia: Evidence for accelerated or exaggerated aging? *Schizophr Res.* junio de 2018;196:14-21.
59. Solís-Vivanco R, Rangel-Hassey F, León-Ortiz P, Mondragón-Maya A, Reyes-Madrugal F, de la Fuente-Sandoval C. Cognitive Impairment in Never-Medicated Individuals on the Schizophrenia Spectrum. *JAMA Psychiatry.* 1 de mayo de 2020;77(5):543-5.
60. Solé B, Jiménez E, Torrent C, Reinares M, Bonnin CDM, Torres I, et al. Cognitive Impairment in Bipolar Disorder: Treatment and Prevention Strategies. *Int J Neuropsychopharmacol.* 1 de agosto de 2017;20(8):670-80.
61. Sánchez-Torres AM, Elosúa MR, Lorente-Omeñaca R, Moreno-Izco L, Peralta V, Cuesta MJ. Lifetime psychopathological dimensions, cognitive impairment and functional outcome in psychosis. *Schizophr Res.* enero de 2017;179:30-5.
62. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1995;57(1):289-300.
63. Tian Y, Morris TJ, Webster AP, Yang Z, Beck S, Feber A, et al. ChAMP: updated methylation analysis pipeline for Illumina BeadChips. *Bioinforma Oxf Engl.* 15 de diciembre de 2017;33(24):3982-4.
64. Houseman EA, Accomando WP, Koestler DC, Christensen BC, Marsit CJ, Nelson HH, et al. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics.* 8 de mayo de 2012;13:86.

65. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 20 de abril de 2015;43(7):e47.
66. Butcher LM, Beck S. Probe Lasso: a novel method to rope in differentially methylated regions with 450K DNA methylation data. *Methods San Diego Calif.* 15 de enero de 2015;72:21-8.
67. Watanabe K, Taskesen E, van Bochoven A, Posthuma D. Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. *Nat Commun.* 28 de noviembre de 2017;8(1):1826.
68. Teschendorff AE, West J, Beck S. Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Hum Mol Genet.* 15 de octubre de 2013;22(R1):R7-15.
69. Xu Z, Niu L, Li L, Taylor JA. ENmix: a novel background correction method for Illumina HumanMethylation450 BeadChip. *Nucleic Acids Res.* 18 de febrero de 2016;44(3):e20.
70. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell.* 24 de enero de 2013;49(2):359-67.
71. Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging.* 18 de abril de 2018;10(4):573-91.
72. Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* 2 de julio de 2019;47(W1):W199-205.
73. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 8 de enero de 2019;47(D1):D607-13.

74. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* noviembre de 2003;13(11):2498-504.
75. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 4 de enero de 2017;45(D1):D353-61.
76. Gillespie A, Hannon E, Dempster E, Collier D, Egerton A, Mill J, et al. SU116. Longitudinal Epigenetic Analysis of Clozapine Use in Treatment-Resistant Schizophrenia. *Schizophr Bull.* marzo de 2017;43(Suppl 1):S203.
77. Hannon E, Dempster EL, Mansell G, Burrage J, Bass N, Bohlken MM, et al. DNA methylation meta-analysis reveals cellular alterations in psychosis and markers of treatment-resistant schizophrenia. *eLife.* 26 de febrero de 2021;10:e58430.
78. Lee MK, Hong Y, Kim SY, London SJ, Kim WJ. DNA methylation and smoking in Korean adults: epigenome-wide association study. *Clin Epigenetics.* 2016;8:103.
79. Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, et al. Effect of Clozapine on DNA Methylation in Peripheral Leukocytes from Patients with Treatment-Resistant Schizophrenia. *Int J Mol Sci.* 14 de marzo de 2017;18(3):632.
80. Melas PA, Rogdaki M, Ösby U, Schalling M, Lavebratt C, Ekström TJ. Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* junio de 2012;26(6):2712-8.
81. Dong E, Tueting P, Matrisciano F, Grayson DR, Guidotti A. Behavioral and molecular neuroepigenetic alterations in prenatally stressed mice: relevance for the study of chromatin remodeling properties of antipsychotic drugs. *Transl Psychiatry.* 12 de enero de 2016;6(1):e711.
82. Seo MK, Kim YH, McIntyre RS, Mansur RB, Lee Y, Carmona NE, et al. Effects of Antipsychotic Drugs on the Epigenetic Modification of Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Expression in the Hippocampi of Chronic Restraint Stress Rats. *Neural Plast.* 2018;2018:2682037.

83. Higgins-Chen AT, Boks MP, Vinkers CH, Kahn RS, Levine ME. Schizophrenia and Epigenetic Aging Biomarkers: Increased Mortality, Reduced Cancer Risk, and Unique Clozapine Effects. *Biol Psychiatry*. 1 de agosto de 2020;88(3):224-35.
84. Corbo RM, Ulizzi L, Positano L, Scacchi R. Association of CYP19 and ESR1 pleiotropic genes with human longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. enero de 2011;66(1):51-5.
85. Han B, Chen H, Yao Y, Liu X, Nie C, Min J, et al. Genetic and non-genetic factors associated with the phenotype of exceptional longevity & normal cognition. *Sci Rep*. 5 de noviembre de 2020;10(1):19140.
86. Garratt M, Lagerborg KA, Tsai YM, Galecki A, Jain M, Miller RA. Male lifespan extension with 17- α estradiol is linked to a sex-specific metabolomic response modulated by gonadal hormones in mice. *Aging Cell*. agosto de 2018;17(4):e12786.
87. Mann SN, Hadad N, Nelson Holte M, Rothman AR, Sathiaseelan R, Ali Mondal S, et al. Health benefits attributed to 17 α -estradiol, a lifespan-extending compound, are mediated through estrogen receptor α . *eLife*. 8 de diciembre de 2020;9:e59616.
88. Vermeulen JM, van Rooijen G, van de Kerkhof MPJ, Sutterland AL, Correll CU, de Haan L. Clozapine and Long-Term Mortality Risk in Patients With Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis of Studies Lasting 1.1-12.5 Years. *Schizophr Bull*. 7 de marzo de 2019;45(2):315-29.
89. Meyer JM, Nasrallah HA, McEvoy JP, Goff DC, Davis SM, Chakos M, et al. The Clinical Antipsychotic Trials Of Intervention Effectiveness (CATIE) Schizophrenia Trial: clinical comparison of subgroups with and without the metabolic syndrome. *Schizophr Res*. 1 de diciembre de 2005;80(1):9-18.
90. Soontornniyomkij V, Lee EE, Jin H, Martin AS, Daly RE, Liu J, et al. Clinical Correlates of Insulin Resistance in Chronic Schizophrenia: Relationship to Negative Symptoms. *Front Psychiatry*. 2019;10:251.
91. Taipale H, Tanskanen A, Mehtälä J, Vattulainen P, Correll CU, Tiihonen J. 20-year follow-up study of physical morbidity and mortality in relationship to antipsychotic

- treatment in a nationwide cohort of 62,250 patients with schizophrenia (FIN20). *World Psychiatry Off J World Psychiatr Assoc WPA*. febrero de 2020;19(1):61-8.
92. Torniaainen M, Mittendorfer-Rutz E, Tanskanen A, Björkenstam C, Suvisaari J, Alexanderson K, et al. Antipsychotic treatment and mortality in schizophrenia. *Schizophr Bull*. mayo de 2015;41(3):656-63.
93. De Lorenzo MS, Chen W, Baljinnyam E, Carlini MJ, La Perle K, Bishop SP, et al. «Reduced malignancy as a mechanism for longevity in mice with adenylyl cyclase type 5 disruption». *Aging Cell*. febrero de 2014;13(1):102-10.
94. Vatner SF, Pachon RE, Vatner DE. Inhibition of adenylyl cyclase type 5 increases longevity and healthful aging through oxidative stress protection. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:250310.
95. Vatner SF, Yan L, Ishikawa Y, Vatner DE, Sadoshima J. Adenylyl cyclase type 5 disruption prolongs longevity and protects the heart against stress. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. febrero de 2009;73(2):195-200.
96. Yan L, Park JY, Dillinger JG, De Lorenzo MS, Yuan C, Lai L, et al. Common mechanisms for calorie restriction and adenylyl cyclase type 5 knockout models of longevity. *Aging Cell*. diciembre de 2012;11(6):1110-20.
97. Yan L, Vatner DE, O'Connor JP, Ivessa A, Ge H, Chen W, et al. Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell*. 27 de julio de 2007;130(2):247-58.
98. Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev*. 15 de diciembre de 2004;18(24):3004-9.
99. Burkewitz K, Weir HJM, Mair WB. AMPK as a Pro-longevity Target. *Exp Suppl* 2012. 2016;107:227-56.
100. Greer EL, Banko MR, Brunet A. AMP-activated protein kinase and FoxO transcription factors in dietary restriction-induced longevity. *Ann N Y Acad Sci*. julio de 2009;1170:688-92.

101. Morgunova GV, Klebanov AA. Age-related AMP-activated protein kinase alterations: From cellular energetics to longevity. *Cell Biochem Funct.* abril de 2019;37(3):169-76.
102. Stancu AL. AMPK activation can delay aging. *Discov Craiova Rom.* 31 de diciembre de 2015;3(4):e53.
103. Farooq S, Taylor M. Clozapine: dangerous orphan or neglected friend? *Br J Psychiatry J Ment Sci.* abril de 2011;198(4):247-9.
104. Cho J, Hayes RD, Jewell A, Kadra G, Shetty H, MacCabe JH, et al. Clozapine and all-cause mortality in treatment-resistant schizophrenia: a historical cohort study. *Acta Psychiatr Scand.* marzo de 2019;139(3):237-47.
105. Hayes RD, Downs J, Chang CK, Jackson RG, Shetty H, Broadbent M, et al. The effect of clozapine on premature mortality: an assessment of clinical monitoring and other potential confounders. *Schizophr Bull.* mayo de 2015;41(3):644-55.
106. Schneider-Thoma J, Efthimiou O, Huhn M, Krause M, Reichelt L, Röder H, et al. Second-generation antipsychotic drugs and short-term mortality: a systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomised controlled trials. *Lancet Psychiatry.* agosto de 2018;5(8):653-63.
107. Janssens GE, Lin XX, Millan-Arriño L, Kavšek A, Sen I, Seinstra RI, et al. Transcriptomics-Based Screening Identifies Pharmacological Inhibition of Hsp90 as a Means to Defer Aging. *Cell Rep.* 9 de abril de 2019;27(2):467-480.e6.
108. Polho GB, Cardillo GM, Kerr DS, Chile T, Gattaz WF, Forlenza OV, et al. Antipsychotics preserve telomere length in peripheral blood mononuclear cells after acute oxidative stress injury. *Neural Regen Res.* mayo de 2022;17(5):1156-60.
109. Monroy-Jaramillo N, Rodríguez-Agudelo Y, Aviña-Cervantes LC, Roberts DL, Velligan DI, Walss-Bass C. Leukocyte telomere length in Hispanic schizophrenia patients under treatment with olanzapine. *J Psychiatr Res.* julio de 2017;90:26-30.
110. Kumar P, Efsthopoulos P, Millischer V, Olsson E, Wei YB, Brüstle O, et al. Mitochondrial DNA copy number is associated with psychosis severity and anti-psychotic treatment. *Sci Rep.* 24 de agosto de 2018;8:12743.

ANEXO I



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

MANUEL VELASCO SUÁREZ

LIC. SANITARIA 04 AM 0913012

CONSENTIMIENTO INFORMADO: "MARCADORES DE ENVEJECIMIENTO EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS Y PSIQUIÁTRICAS"

NOMBRE DEL PACIENTE _____	FECHA _____	HORA _____
REGISTRO _____	FECHA EN LA QUE SE REALIZARÁ EL PROCEDIMIENTO _____	
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL _____		

Yo _____, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi calidad de paciente, o representante legal de éste:

DECLARO EN FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA LO SIGUIENTE:

He sido invitado/a para participar voluntariamente en el protocolo de investigación: "MARCADORES DE ENVEJECIMIENTO EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS Y PSIQUIÁTRICAS".

✓ He sido informado/a que padezco o algún familiar padece (Marque una de las siguientes opciones):

EPILEPSIA____ PSICOSIS INTERICTAL____ ESQUIZOFRENIA____

TRASTORNO ESQUIZOAFECTIVO (TEE) ____ TRASTORNO BIPOLAR____

ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP)____

✓ He sido informado/a que las enfermedades neurológicas (arriba mencionadas) son padecimientos crónicos que pueden presentar reactividad emocional alterada, conducta desorganizada y alteraciones cognitivas con respuesta variable al tratamiento y remisión parcial. Además, estos padecimientos están relacionados con el envejecimiento biológico y por lo tanto, las funciones corporales empiezan a deteriorarse, llevando al desarrollo de estos padecimientos. Actualmente no se conocen los mecanismos que determinan la aparición de estas enfermedades; sin embargo se sabe que diferentes factores genéticos pueden contribuir al envejecimiento biológico en las distintas enfermedades neurológicas impactando en la evolución, tratamiento y cognición en dichas enfermedades.

✓ He sido informado/a que el objetivo general de este estudio es analizar diferentes marcadores de envejecimiento en tres grupos de enfermedades neurológicas junto con controles pareados que contribuyan a la comprensión de la fisiopatología de estas enfermedades, además, de evaluar factores sociodemográficos y evaluación cognitiva para identificar mecanismos involucrados en el envejecimiento acelerado observado en EP, epilepsia y TEE. Los resultados de este protocolo de investigación nos permitirán

identificar factores asociados con el envejecimiento acelerado y que contribuyan a la comprensión de la evolución, tratamiento y cognición en dichas enfermedades.

- ✓ He sido informado/a que para participar en este estudio, en primera instancia se me realizará una historia clínica completa, la cual incluye la elaboración de árbol genealógico, con la finalidad de identificar a otros familiares que posiblemente estén afectados, acto seguido se me tomará una muestra de sangre periférica de la cual se extraerá el material genético (DNA) y se estudiarán marcadores genéticos asociados con el envejecimiento biológico.
- ✓ He sido informado/a que cuando se realiza la toma de muestra de sangre, podré experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local.
- ✓ He sido informado/a que mi información clínica recopilada es confidencial. El nombre de los participantes será codificado y nunca aparecerá en ningún reporte o publicación.
- ✓ He sido informado/a que mi participación en este estudio no tendrá ningún costo ni recibiré remuneración económica alguna.
- ✓ He sido informado/a que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento. Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.
- ✓ He sido informado/a que mi tratamiento y la actitud de los doctores hacia mí no se verán afectados en el caso de decidir que no deseo formar parte de este estudio. La negativa a participar no afectará cualquier beneficio para el cual yo de otra forma tenga derecho. También podré retirarme una vez enrolado/a durante el estudio si es que así lo deseo, con las mismas implicaciones mencionadas previamente.
- ✓ He sido informado/a que este estudio es a largo plazo (3 años) y requiere de la participación de un gran número de pacientes con estas enfermedades. Una vez terminado el estudio, sólo si los resultados son de relevancia para mí, se me contactará para comunicármelos y explicármelos.
- ✓ He sido informado/a que mi DNA puede ser usado para esta investigación y otras en las que se están analizando genes de la población mexicana, por tanto acepto que mi muestra sea usada en otros proyectos: SI _____ NO _____.
- ✓ He sido informado/a que si me surgen dudas puedo contactar al Dr. David J. Dávila Ortiz de Montellano o la Dra. Nancy Monroy Jaramillo del departamento de Neurogenética y Biología Molecular, las puedo localizar en el Tel. (55) 56 06 38 22 Ext. 2018. También puedo comunicarme al Comité de Ética en Investigación, a la ext. 5027.
- ✓ Después de haber leído cuidadosamente este documento acepto **VOLUNTARIAMENTE** participar en el presente estudio.

Domicilio: _____

Teléfono: _____ Correo electrónico: _____

NOMBRE, FIRMA Y CÉDULA DEL MÉDICO

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

ANEXO II



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ
LIC. SANITARIA 04 AM 0913012

CONSENTIMIENTO INFORMADO: "IMPACTO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INDIVIDUAL EN LA FARMACOCINÉTICA DE CLOZAPINA Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA CLÍNICA EN PACIENTES CON TRASTORNOS PSICÓTICOS"

NOMBRE DEL PACIENTE _____	FECHA _____	HORA _____
REGISTRO _____	FECHA EN LA QUE SE REALIZARÁ EL PROCEDIMIENTO _____	
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL _____		

Yo _____, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi calidad de paciente, o representante legal de éste:

DECLARO EN FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA LO SIGUIENTE:

- ✓ He sido invitado/a a participar voluntariamente en el protocolo de investigación: "Impacto de la variabilidad genética individual en la farmacocinética de clozapina y su asociación con la respuesta clínica en pacientes con espectro esquizo-afectivo".
- ✓ He sido informado/a que padezco o algún familiar padece (Marque una de las siguientes opciones):
ESQUIZOFRENIA ___ TRASTORNO ESQUIZOAFECTIVO _____ TRASTORNO BIPOLAR _____
- ✓ He sido informado/a que los trastornos psicóticos (ambos mencionados) son padecimientos psiquiátricos crónicos que puede presentar reactividad emocional alterada, conducta desorganizada y alteraciones cognitivas con respuesta variable al tratamiento y remisión parcial. Actualmente no se conocen los mecanismos que determinan la aparición de estas enfermedades; sin embargo se sabe que los factores genéticos pueden contribuir a la respuesta al tratamiento y a las reacciones adversas asociadas a éste.
- ✓ He sido informado/a que el objetivo general de este estudio es evaluar la asociación entre el perfil genético, las concentraciones plasmáticas del antipsicótico clozapina, junto con la respuesta terapéutica (eficacia, ineficacia y reacciones adversas) en pacientes mestizo mexicanos con espectro esquizo-afectivo (diagnóstico clínico de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo y trastorno bipolar). Adicionalmente, se comparará el perfil genético de pacientes con controles sanos. Los resultados de este protocolo de investigación nos permitirán identificar factores asociados a la respuesta terapéutica y factores de riesgo para el desarrollo de reacciones adversas asociadas al tratamiento con clozapina.
- ✓ He sido informado/a que para participar en este estudio, en primera instancia se me realizará una historia clínica completa, la cual incluye la elaboración de árbol genealógico, con la finalidad de identificar a otros familiares que posiblemente estén afectados, acto seguido se me tomará una muestra de sangre periférica de la cual se extraerá el material genético (DNA) y se estudiarán diferentes variantes genéticas asociadas con la farmacocinética de la clozapina.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ
LIC. SANITARIA 04 AM 0913012

CONSENTIMIENTO INFORMADO: "IMPACTO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INDIVIDUAL EN LA FARMACOCINÉTICA DE CLOZAPINA Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA CLÍNICA EN PACIENTES CON TRASTORNOS PSICÓTICOS"

- ✓ He sido informado/a que cuando se realiza la toma de muestra de sangre, podré experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local.
- ✓ He sido informado/a que mi información clínica recopilada es confidencial. El nombre de los participantes está codificado y nunca aparecerá en ningún reporte o publicación.
- ✓ He sido informado/a que mi participación en este estudio no tendrá ningún costo ni recibiré remuneración económica alguna.
- ✓ He sido informado/a que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento. Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.
- ✓ He sido informado/a que mi tratamiento y la actitud de los doctores hacia mi no se verán afectados en el caso de decidir que no deseo formar parte de este estudio. La negativa a participar no afectará cualquier beneficio para el cual yo de otra forma tenga derecho. También podré retirarme una vez enrolado/a durante el estudio si es que así lo deseo, con las mismas implicaciones mencionadas previamente.
- ✓ He sido informado/a que este estudio es a largo plazo (3 años) y requiere de la participación de un gran número de pacientes con estas enfermedades. Una vez terminado el estudio, sólo si los resultados son de relevancia para mí, se me contactará para comunicármelos y explicármelos.
- ✓ He sido informado/a que mi DNA puede ser usado para esta investigación y otras en las que se están analizando genes de la población mexicana, por tanto acepto que mi muestra sea usada en otros proyectos: SI NO
- ✓ He sido informado/a que si me surgen dudas puedo contactar a la Dra. Alejandra Camacho Molina, al Dr. David J. Dávila Ortiz de Montellano o la Dra. Nancy Monroy Jaramillo del departamento de Neurogenética y Biología Molecular, las puedo localizar en el Tel. (55) 56 06 38 22 Exts. 1071, 2018 y 3041. También puedo comunicarme al Comité de Ética en Investigación, a la ext. 5027.
- ✓ Después de haber leído cuidadosamente este documento acepto **VOLUNTARIAMENTE** participar en el presente estudio.

Domicilio: _____

Teléfono: _____

Correo electrónico: _____

ANEXO III



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

MANUEL VELASCO SUÁREZ

LIC. SANITARIA 04 AM 0913012

CONSENTIMIENTO INFORMADO: "MARCADORES DE ENVEJECIMIENTO EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS Y PSIQUIÁTRICAS" PROTOCOLO 38/19.

NOMBRE	FECHA	HORA
REGISTRO	FECHA EN LA QUE SE REALIZARÁ EL PROCEDIMIENTO	

Yo _____, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi calidad de voluntario sano:

DECLARO EN FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA LO SIGUIENTE:

He sido invitado/a para participar voluntariamente en el protocolo de investigación: "MARCADORES DE ENVEJECIMIENTO EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS Y PSIQUIÁTRICAS".

- ✓ He sido informado/a que NO padezco y que no tengo antecedentes de familiares que padezcan enfermedades neurológicas o neuropsiquiátricas, tales como:
EPILEPSIA PSICOSIS INTERICTAL ESQUIZOFRENIA
TRASTORNO ESQUIZOAFECTIVO (TEE) TRASTORNO BIPOLAR
ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP) DEMENCIA (TIPO ALZHEIMER U OTRA)
- ✓ He sido informado/a que las enfermedades neurológicas (arriba mencionadas) son padecimientos crónicos que pueden presentar reactividad emocional alterada, conducta desorganizada y alteraciones cognitivas con respuesta variable al tratamiento y remisión parcial. Además, estos padecimientos están relacionados con el envejecimiento biológico y por lo tanto, las funciones corporales empiezan a deteriorarse, llevando al desarrollo de estos padecimientos. Actualmente no se conocen los mecanismos que determinan la aparición de estas enfermedades; sin embargo, se sabe que diferentes factores genéticos pueden contribuir al envejecimiento biológico en las distintas enfermedades neurológicas impactando en la evolución, tratamiento y cognición en dichas enfermedades.
- ✓ He sido informado/a que el objetivo general de este estudio es analizar diferentes marcadores de envejecimiento en enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas junto con controles pareados que contribuyan a la comprensión de la fisiopatología de estas enfermedades, además, de evaluar factores sociodemográficos y evaluación cognitiva para identificar mecanismos involucrados en el envejecimiento acelerado observado en enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas. Los resultados de este protocolo

de investigación nos permitirán identificar factores asociados con el envejecimiento acelerado y que contribuyan a la comprensión de la evolución, tratamiento y cognición en dichas enfermedades.

- ✓ He sido informado/a que, para participar en este estudio, en primera instancia se me realizará una historia clínica completa, la cual incluye la elaboración de árbol genealógico, con la finalidad de identificar a otros familiares que posiblemente estén afectados, acto seguido se me tomará una muestra de sangre periférica de la cual se extraerá el material genético (DNA) y se estudiarán marcadores genéticos asociados con el envejecimiento biológico.
- ✓ He sido informado que además de la muestra de sangre, se me realizarán algunos estudios cognitivos en el Depto. de Neuropsicología sin costo alguno.
- ✓ He sido informado/a que cuando se realiza la toma de muestra de sangre, podré experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local.
- ✓ He sido informado/a que mi información clínica recopilada es confidencial. El nombre de los participantes será codificado y nunca aparecerá en ningún reporte o publicación.
- ✓ He sido informado/a que mi participación en este estudio no tendrá ningún costo ni recibiré remuneración económica alguna.
- ✓ He sido informado/a que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento. Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.
- ✓ He sido informado/a que podré retirarme una vez enrolado/a durante el estudio si es que así lo deseo, con las mismas implicaciones mencionadas previamente.
- ✓ He sido informado/a que este estudio es a largo plazo (3 años) y requiere de la participación de un gran número de pacientes y controles. He sido informado/a que, una vez terminado el estudio, no recibiré resultados. Si los resultados son de relevancia para mí, se me contactará para comunicármelos y explicármelos.
- ✓ He sido informado/a que mi DNA puede ser usado para esta investigación y otras en las que se están analizando genes de la población mexicana, por tanto, acepto que mi muestra sea usada en otros proyectos: SI_____ NO_____.
- ✓ He sido informado/a que si me surgen dudas puedo contactar al Dr. David J. Dávila Ortiz de Montellano o la Dra. Nancy Monroy Jaramillo del departamento de Neurogenética y Biología Molecular, las puedo localizar en el Tel. (55) 56 06 38 22 Ext. 2018. También puedo comunicarme al Comité de Ética en Investigación, a la ext. 5027.
- ✓ Después de haber leído cuidadosamente este documento acepto **VOLUNTARIAMENTE** participar en el presente estudio.

Domicilio: _____

Teléfono: _____ Correo electrónico: _____

NOMBRE, FIRMA Y CÉDULA DEL MÉDICO

NOMBRE Y FIRMA DEL PARTICIPANTE

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

**ANEXO IV. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO SUJETOS CONTROL
PROYECTO UAM XOCHIMILCO**



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
Laboratorio de Genética Molecular**

Ciudad de México a ____ de _____ del 202__

1. He sido informado/a que en el Departamento de Genética Molecular de esta universidad se están realizando estudios para determinar las variaciones en genes (que son las unidades de la herencia) en personas, aparentemente sanas, de la población mexicana.
2. He sido informado/a que para analizar estos genes es necesario que done una muestra de 20 ml de sangre periférica para que de ahí se extraiga el ADN que es el material hereditario y se estudie los genes antes mencionados.
3. He sido informado/a que puedo sufrir enrojecimiento o ardor en la zona de punción.
4. He sido informado/a que se me hará un árbol genealógico y se me preguntará acerca de las enfermedades que he padecido, así como las de mi familia.
5. He sido informado/a que toda la información obtenida será confidencial y estará disponible solo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de letras y números para proteger mi identidad.
6. He sido informado/a que mi participación en este estudio es **VOLUNTARIA** y no tiene costo alguno para mí ni recibiré remuneración alguna.
7. He sido informado/a que de acuerdo al artículo 103 Bis 4 capítulo único, título quinto Bis de la Ley General de Salud, si deseo conocer los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra y si deseo participar en otros estudios, seré contactado por los investigadores.
8. He sido informado/a de la garantía que tengo para recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a las dudas que surjan respecto a los asuntos relacionados con esta variación genética.
9. Para cualquier duda o aclaración puede dirigirse al Laboratorio de Genética Molecular Lab. 103 edificio N (UIDIS) o comunicarse al teléfono 54837000 ext. 3655.

ANTECEDENTES PERSONALES

Tabaquismo	Si	No	Años de consumo _____ Cantidad promedio a la semana _____
Alcohol	Si	No	Años de consumo _____ Tipo (Destilados o fermentados) _____ Cantidad de consumo al mes _____

Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud

Drogas Si No Tipo y frecuencia de consumo _____
Sedentarismo Si No
Hipertensión Si No Años de evolución _____
Diabetes Mellitus Si No Años de evolución _____
Colesterol alto Si No Años de evolución _____
Cardiopatía Si No Años de evolución _____
Insuficiencia arterial Si No Años de evolución _____
Alergias a medicamentos: Tipo de alergia _____ Medicamento _____
Otras (especificar): _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

ENFERMEDAD	Si	No	FAMILIAR AFECTADO
EMBOLIA CEREBRAL			
COLESTEROL			
DIABETES			
PARKINSON			
PERDIDA DE MEMORIA			
EPILEPSIA			
CANCER			
TIPO DE CANCER			

FIRMA DEL SUJETO DE INVESTIGACIÓN Y RESPONSABLE LEGAL

AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR **VOLUNTARIAMENTE** EN LA INVESTIGACIÓN DESCRITA.

Nombre del participante: _____ Género: H M

Firma: _____ Teléfono: _____

Correo electrónico: _____

Dirección: _____

Origen: _____ Ocupación: _____

Edad: _____ Fecha de nacimiento: _____

Edo. Civil: _____ Escolaridad: _____

Testigo

Testigo

Nombre del (la) investigador/a que obtuvo el consentimiento _____

Firma _____



Clozapine Long-Term Treatment Might Reduce Epigenetic Age Through Hypomethylation of Longevity Regulatory Pathways Genes

OPEN ACCESS

Edited by:

Mirko Manchia,
University of Cagliari, Italy

Reviewed by:

Stefania Schiavone,
University of Foggia, Italy
Alessio Squassina,
University of Cagliari, Italy

*Correspondence:

Humberto Nicolini
hnicolini@inmegen.gob.mx
Nancy Monroy-Jaramillo
nancy.monroy@innn.edu.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Psychopharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Psychiatry

Received: 07 February 2022

Accepted: 29 March 2022

Published: 18 May 2022

Citation:

Pérez-Aldana BE,
Martínez-Magaña JJ,
Mayén-Lobo YG,
Dávila-Ortiz de Montellano DJ,
Aviña-Cervantes CL,
Ortega-Vázquez A,
Genis-Mendoza AD, Sarmiento E,
Soto-Reyes E, Juárez-Rojop IE,
Tovilla-Zarate CA,
González-Castro TB, Nicolini H,
López-López M and
Monroy-Jaramillo N (2022) Clozapine
Long-Term Treatment Might Reduce
Epigenetic Age Through
Hypomethylation of Longevity
Regulatory Pathways Genes.
Front. Psychiatry 13:870656.
doi: 10.3389/fpsy.2022.870656

**Blanca Estela Pérez-Aldana¹, José Jaime Martínez-Magaña²,
Yerye Gibrán Mayén-Lobo³, David José Dávila-Ortiz de Montellano⁴,
Carlos Luis Aviña-Cervantes⁵, Alberto Ortega-Vázquez³, Alma Delia Genis-Mendoza²,
Emmanuel Sarmiento⁶, Ernesto Soto-Reyes⁷, Isela Esther Juárez-Rojop⁸,
Carlos Alfonso Tovilla-Zarate⁹, Thelma Beatriz González-Castro¹⁰,
Humberto Nicolini^{2,11*}, Marisol López-López³ and Nancy Monroy-Jaramillo^{4*}**

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico, ² Laboratorio de Genómica de Enfermedades Psiquiátricas y Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico, ³ Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico,

⁴ Departamento de Genética, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico,

⁵ Departamento de Psiquiatría, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico,

⁶ Dirección General, Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N Navarro, Mexico City, Mexico, ⁷ Departamento de Ciencias

Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Mexico City, Mexico, ⁸ División Académica de Ciencias

de la Salud, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Mexico, ⁹ División Académica Multidisciplinaria

de Comalcalco, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Comalcalco, Mexico, ¹⁰ División Académica Multidisciplinaria

de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Jalpa de Méndez, Mexico, ¹¹ Grupo de Estudios Médicos y

Familiares Carracci, Mexico City, Mexico

Long-term studies have shown significantly lower mortality rates in patients with continuous clozapine (CLZ) treatment than other antipsychotics. We aimed to evaluate epigenetic age and DNA methylome differences between CLZ-treated patients and those without psychopharmacological treatment. The DNA methylome was analyzed using the Infinium MethylationEPIC BeadChip in 31 CLZ-treated patients with psychotic disorders and 56 patients with psychiatric disorders naive to psychopharmacological treatment. Delta age (Δ age) was calculated as the difference between predicted epigenetic age and chronological age. CLZ-treated patients were stratified by sex, age, and years of treatment. Differential methylation sites between both groups were determined using linear regression models. The Δ age in CLZ-treated patients was on average lower compared with drug-naive patients for the three clocks analyzed; however, after data-stratification, this difference remained only in male patients. Additional differences were observed in Hannum and Horvath clocks when comparing chronological age and years of CLZ treatment. We identified 44,716 differentially methylated sites, of which 87.7% were hypomethylated in CLZ-treated patients, and

enriched in the longevity pathway genes. Moreover, by protein–protein interaction, AMPK and insulin signaling pathways were found enriched. CLZ could promote a lower Δ age in individuals with long-term treatment and modify the DNA methylome of the longevity-regulating pathways genes.

Keywords: DNA methylome, clozapine, psychotic disorders, epigenetic age, longevity

INTRODUCTION

There is evidence of premature mortality and an increase in physical comorbidity in patients with psychiatric disorders (1). On average, their life expectancy is reduced from 12 to 15 years compared with the general population (2, 3). Some authors have proposed that the increased mortality could correlate with increased biological aging (4–6). Various epigenetic age estimators of biological age have been developed based on DNA methylation status across a set of CpG sites in cells/tissues, and these have been shown to correlate with the risk of developing age-related conditions and diseases (7–9). Moreover, the presence of psychotic symptoms is observed in different psychiatric illnesses (mainly schizophrenia and bipolar disorder), contributing to this mortality. A recent study reported a positive correlation between epigenetic aging and psychosis severity (10). Fortunately, psychotic symptoms can be controlled with the use of antipsychotics, which also help in reducing the risk of psychotic relapse (11).

On the other hand, the adverse cardiac and metabolic effects of antipsychotics are well known. However, their use in patients with schizophrenia is associated with lower mortality (12). There is evidence demonstrating a 30–50% lower risk of mortality related to the use of antipsychotics compared with non-use (13, 14). In particular, the long-term use of clozapine (CLZ) has been associated with the lowest mortality (12, 15, 16). CLZ is the antipsychotic of choice for patients with refractory psychosis (17), for reducing suicide, and for improving longevity (18). Epidemiological data (19, 20) have supported this last point. Some studies suggest that CLZ promotes epigenetic changes with pro-longevity effects (21, 22), and a recent work has proposed that CLZ may reduce epigenetic aging (23).

The present work aimed to evaluate epigenetic age and DNA methylome differences between patients treated with CLZ and psychiatric patients without psychopharmacological treatment.

MATERIALS AND METHODS

Sample Population

In this study, 87 individuals of Mexican ascendancy were included. Of them, 31 were diagnosed with refractory psychosis and treated with CLZ (CLZ-treated patients), and 56 had early onset psychiatric disorders. This last group of patients has not had any previous psychopharmacological treatment and will be called as drug-naïve patients. Samples from both groups of patients were recruited from the outpatient clinics. The CLZ-treated patients with refractory psychosis were recruited from the

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNNMVS), and drug-naïve patients from the Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N. Navarro and the Hospital General Dr. Gustavo Rivorosa Pérez. At least one specialized psychiatrist performed the diagnosis. Individuals with intellectual disabilities, heavy drinkers, smokers, or substance abusers were excluded. In addition, we excluded drug-naïve patients who had begun psychopharmacological treatment. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Research and Bioethics Committees of INNNMVS (protocol 38/19), the Ethics Committee of the Children's Psychiatric Hospital Dr. Juan N. Navarro with approval No. I13/01/0913 (11 October 2017), and by the Ethics Committee of the National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN) with approval No. 06/2018/I. Furthermore, all individuals signed informed consents. For those patients under the age of 18 years, an informed assent letter was signed by both parents/guardians and the minor.

Analysis and Quality Control of Microarrays

Blood DNA extraction, bisulfite-conversion (Zymo, Irvine, CA, United States), and microarray hybridization (Infinium MethylationEPIC BeadChip, Illumina, San Diego, CA, United States) were performed according to the manufacturer's protocol. We used the Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37/hg19) as position reference for all the analyses. The fluorescence intensities were measured with the iScan instrument and transformed into idat files with the algorithm implemented in the GenomeStudio software (Illumina, San Diego, CA, United States). Specialized staff carried out microarray analyses in the INMEGEN. The ChAMP (24) package was used for quality control. Briefly, the probes using the following filters were removed: (i) detection p greater than 0.01, (ii) less than three beads in less than 5% of the samples, (iii) all non-CpG sites, (iv) single nucleotide polymorphism (SNP)-associated probes, (v) probes associated with sex chromosomes, and (vi) multi-hit probes. In addition, samples with a ratio greater than 0.1 were removed, resulting in one individual filtered out. After quality control, a matrix of beta values was constructed.

Epigenetic Age Calculation

We normalized the previous beta value matrix by beta-mixture quantile normalization (25) and calculated epigenetic ages with the *ENmix* package (26). This package allowed us to calculate three epigenetic clocks: Hannum (7), Horvath (8), and DNAm PhenoAge (9). The epigenetic ages calculated with the Horvath,

Hannum, and PhenoAge clocks and the chronological age in both groups were compared by correlation analysis. Then, we calculated the delta of age (Δ age = epigenetic age – chronological age), subtracting the chronological age from the estimated epigenetic age in all samples and by each clock. Finally, we compared the Δ age of each clock between CLZ-treated patients and drug-naive patients. First, stratified analysis by sex and age was carried out, comparing the CLZ-treated patients vs. drug-naive patients. The CLZ-treated patients' group was later subdivided into subgroups according to the time's mean of treatment with CLZ (>9 and ≤ 9 years of treatment; i.e., few and many years of treatment, respectively) and according to the mean chronological age (cut-off value = 37 years; i.e., young and older patients). Due to the small sample size, and to achieve subgroups with a similar number of patients (n), the mean values of the years of CLZ treatment and chronological age of patients were used. The student's t -test was applied for the analysis of these four subgroups.

Differentially Methylation Sites Analysis

We removed the batch effect and adjusted blood cell proportion on the normalized beta values matrix with a single-value deconvolution (*champ.SVD* and *champ.runCombat*) and a reference base analysis (*champ.refbase*), respectively (24, 27). Once adjusted, we analyzed differentially methylated sites analysis by linear models implemented in *champ.DMP* function of the *ChAMP* package (28). First, we analyzed differentially methylated sites considering significance at a p lower than $1e-08$ (a summary of statistics is available in **Supplementary Table 1**). Then, after identifying differentially methylated sites, a differentially methylated region analysis was carried out with the ProbeLasso algorithm (29) (a summary statistics of the differential methylation region analysis is available in **Supplementary Table 2**).

Pathway Enrichment and Protein-Protein Interactions

We performed pathway enrichment after extracting genes resulting from differentially methylated sites and regions through the WebGestalt platform (WEB-based GEne SeT Analysis Toolkit) with free access (30) (all pathways of this enrichment are available on **Supplementary Table 3**). First, we analyzed protein-protein interactions between gene products identified using the web application String (31) and plotted the interactions with Cytoscape 3.8.1 software (32). Then, a sub-enrichment analysis of the longevity regulating pathway was performed in String using the KEGG pathway database (33).

RESULTS

Study Population

In this study, eighty-seven individuals were included and classified into two groups: the CLZ-treated patients with refractory psychosis ($n = 31$), and the drug-naive patients with psychiatric disorders ($n = 56$) (**Table 1**). The

TABLE 1 | Clinical and demographic characteristics of all patients.

Characteristic	CLZ-treated patients ($n = 31$)	Drug naive patients ($n = 56$)
Age in years (mean \pm DE)	37.74 \pm 12.18	17.12 \pm 7.84
Sex (%)		
Male	18 (58.1)	13 (23.2)
Female	13 (41.9)	43 (76.8)
Diagnosis (%)		
Major depressive disorder	0	19 (33.9)
Attention-deficit hyperactivity disorder	0	32 (57.1)
Schizophrenia/early onset psychosis	19 (61.3)	5 (9.0)
Bipolar Disorder	3 (9.6)	0
Schizoaffective Spectrum Disorder	8 (25.8)	0
Psychotic Depressive Episode	1 (3.2)	0
Comorbidities (see text)		
Yes	19 (61.3)	50
No	12 (38.7)	6
CLZ Treatment years (mean \pm DE)	9.22 \pm 7.54	0 (0.0)
Concomitant treatment (%)		
Yes	29 (93.6)	0 (0.0)
Anxiolytics	17 (54.8)	0 (0.0)
Antidepressants	20 (64.5)	0 (0.0)
Anticonvulsants ⁺	13 (41.9)	0 (0.0)
Anticholinergics	2 (6.4)	0 (0.0)
No	2 (6.4)	56 (100)
Alcohol consumption (%)		
Yes	10 (32.3)	0 (0.0)
No	21 (67.7)	56 (100)
Drugs consumption (%)		
Yes	8 (25.8) [‡]	0 (0.0)
No	23 (74.2)	56 (100)
Tobacco use (%)		
Yes	14 (45.2)	0 (0.0)
No	17 (54.8)	56 (100)
CLZ dosage (mg/day)	207.76 \pm 128.71	0 (0.0)

[‡]These patients were former consumers of marijuana. ⁺Including 1/1/8 patients receiving carbamazepine/phenytoin/valproate. SD, standard deviation.

following comorbidities were observed in CLZ-treated patients: diabetes (22.6%), epilepsy (16.1%), hyperlipidemia (12.9%), hypercholesterolemia (6.4%), hypothyroidism (6.4%), hypertension (9.7%), and obsessive-compulsive disorder (3.2%). Details about the comorbidities found in the naive patients have been previously reported (34).

Epigenetic Age in Clozapine-Treated Patients vs. Drug-Naive Patients

The variable sex did not show a significant correlation with epigenetic age; however, it was considered in the model as previous reports have demonstrated differences in the epigenetic age between men and women (23). The years of CLZ treatment correlated with epigenetic age in the PhenoAge clock ($t = 2.6041$, $r^2 = 0.4415$, $p = 0.01458$); thus, these two variables were included in the stratification of the patients. The chronological

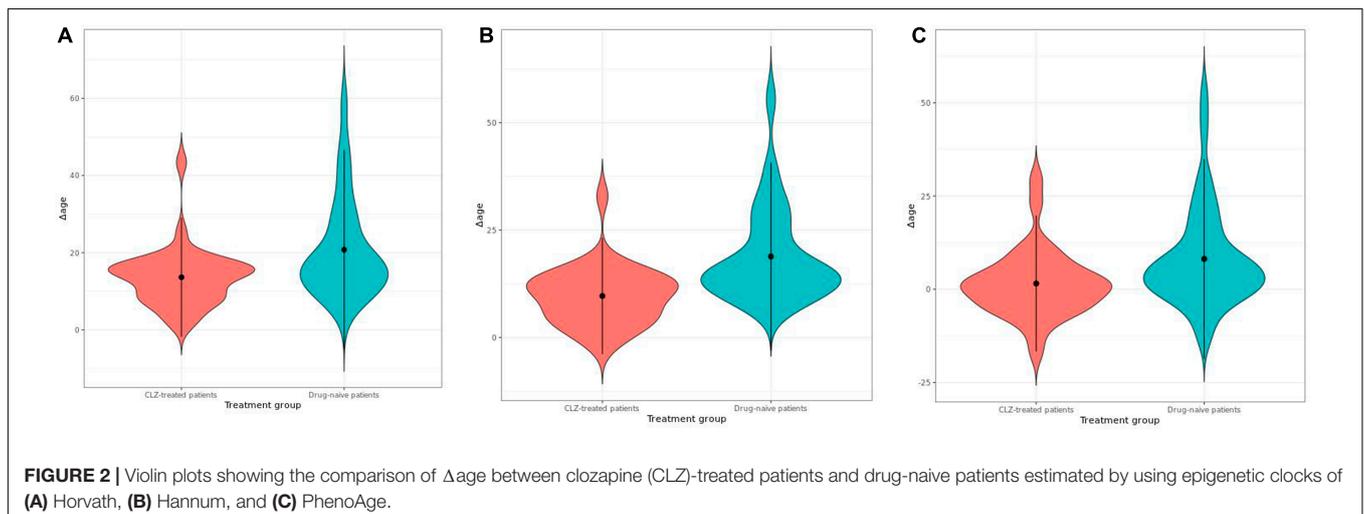
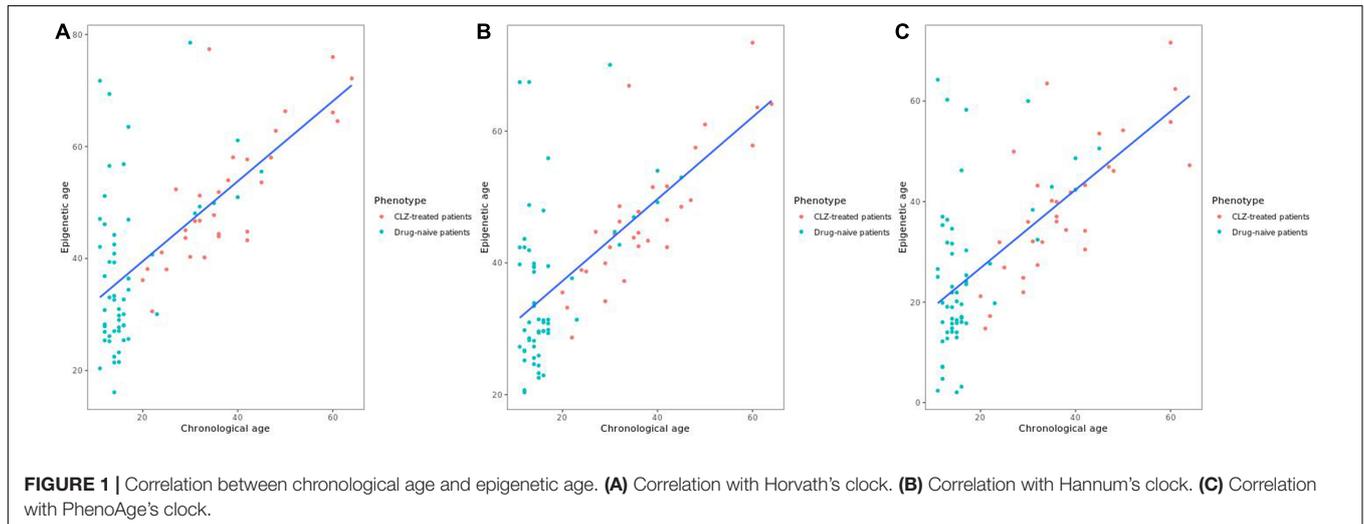
age positively correlated with the epigenetic age in all clocks, Hannum ($r^2 = 0.679$, $p = 4.96e-13$), Horvath ($r^2 = 0.662$, $p = 2.85e-12$), and PhenoAge ($r^2 = 0.664$, p -value = $2.26e-12$) (Figure 1). After obtaining the Δ age for all samples, we found that the CLZ-treated patients' group had a smaller Δ age compared with drug-naïve patients (Figure 2). This difference was significant for the three analyzed clocks: Horvath ($t = -3.23$, $p = 0.0018$), Hannum ($t = -4.83$, $p = 6.0740e-06$), and PhenoAge ($t = -2.72$, $p = 0.0079$). Hannum's clock showed the most significant value. The mean Δ age in the CLZ-treated patients was 13.64, 9.65, and 1.54 years for Horvath, Hannum, and PhenoAge clocks, respectively. In drug-naïve patients, the mean Δ age was 20.77, 18.84, and 8.15 years in the same mentioned order for the three clocks.

The stratified analysis by sex and age, after comparing CLZ-treated patients vs. drug-naïve patients, showed significant differences in the three clocks only for CLZ-treated male patients with mean Δ age values of 13.15, 10.07, and 1.60 years for the Horvath, Hannum, and PhenoAge clocks, respectively, showing corresponding values of p of 0.0376, 0.0073, and

0.0370 (Supplementary Figure 1A). The mean Δ age in CLZ-treated female patients was 14.30, 9.06, and 1.47 years for the Horvath, Hannum, and PhenoAge clocks, respectively. However, significant differences were only found in Hannum's clock ($t = -3.2253$, $p = 0.0035$). Thus, we did not identify differences between age subgroups (Supplementary Figure 1B).

Comparison of Δ age in Older and Younger Patients Treated With Clozapine

We explored Δ age differences in CLZ-treated patients, subdivided according to the mean value of chronological age (37.74 years) and the mean treatment time with CLZ (9.22 years). Significant differences of Δ age for the Horvath and Hannum clocks were observed between patients by years of CLZ treatment and chronological age (younger vs. older patients, and few years of treatment vs. many years of treatment, respectively). In addition, other significant differences were found for the Hannum clock in the following comparisons: older patients with more years of treatment (>9.22 years) vs. younger patients with



more years of treatment ($p = 0.0021$); older patients with many years of treatment vs. young patients with few years of treatment ($p = 0.0263$); and older patients with few years of treatment vs. young patients with many years of treatment ($p = 0.0236$) (**Figure 3A**). Regarding Horvath's clock, we only observed differences between the group of older patients with many years of treatment and younger patients with many years of treatment ($p = 0.019$) (**Figure 3B**).

Differentially Methylated Sites

We identified 44,716 differentially methylated sites between CLZ-treated patients and drug-naive patients. Of note, 39,204 CpG sites (87.70%) were hypomethylated in the CLZ-treated patients, and the remaining (5,512 CpG sites, 12.30%) were hyper-methylated.

According to the position of the differentially methylated sites in relation to the gene structure, the following distribution was observed: 9,573 (24.42%) hypomethylated sites were located at 200 nucleotides of the transcriptional start site (TSS200), 7,247 (18.49%) sites on TSS1500, 7,126 (18.18%) on gene body, 5,332 (13.6%) on 5'-UTR, 4,626 (11.8%) on first exon, 306 (0.78%) on 3'-UTR, and 22 (0.06%) on exon binding sites. The distribution of the hypermethylated sites was as follows: 3,111 (56.44%) sites were annotated to gene body, 266 (4.83%) on 5'-UTR, 265 (4.81%) on TSS1500, 262 (4.75%) on 3'-UTR, 138 (2.5%) were located on the TSS200, 75 (1.36%) on first exon, and 55 (0.1%) on exon binding sites.

The location of differentially methylated sites concerning CpG islands was as follows: 29,895 (66.86%) sites on CpG islands, 7,860 sites (17.56%) on shores, 5,808 sites (12.99%) on the open sea, and 1,153 sites (2.58%) on shelves. Regarding hypomethylated sites, 29,020 of them (74%) were found on CpG islands, 6,822

(17.4%) on shores, 2,892 sites (7.38%) on the open sea, and 470 (1.2%) sites on shelves. The distribution of the hypermethylated sites was: 2,916 (52.9%) sites located on the open sea, 1,038 (18.83%) sites on shores, 875 (15.87%) sites on CpG islands, and 683 (12.39%) sites on shelves.

Enrichment of the Genes Located Within the Differentially Methylated Sites

In total, sixty-five pathways enriched at the hypomethylated sites were identified, and the main ones were involved in the biosynthesis of glycosaminoglycan, glioma, longevity regulatory pathway, VEGF signaling pathway, and circadian rhythm. Additionally, the hypermethylated sites are enriched on ABC transporters and endocytosis pathways (**Table 2**). **Supplementary Table 2** contains the enrichment of all the observed pathways. Among the enriched pathways at the hypomethylated sites, the longevity pathway was identified, which, in turn, interacts with others, such as the AMPK and the insulin signaling pathways. The longevity regulating pathway occupied the 21st place of the ranked list generated by the pathway enrichment; it showed an overlap of 74 genes out of an expected 89 [$p = 1.25e-7$, false discovery rate (FDR) = $1.14e-6$, and enrichment ratio = 1.4578]. We sub-analyzed the longevity regulating pathway because CLZ has been associated with a reduced mortality risk compared with other antipsychotics. For this purpose, a sub-enrichment analysis using protein-protein interaction on this pathway (**Figure 4**) was performed.

Differentially Methylated Regions

A total of 286 differentially methylated regions were identified, of which 247 regions were hypomethylated and 39 hypermethylated. Then, the FUMA platform [Functional

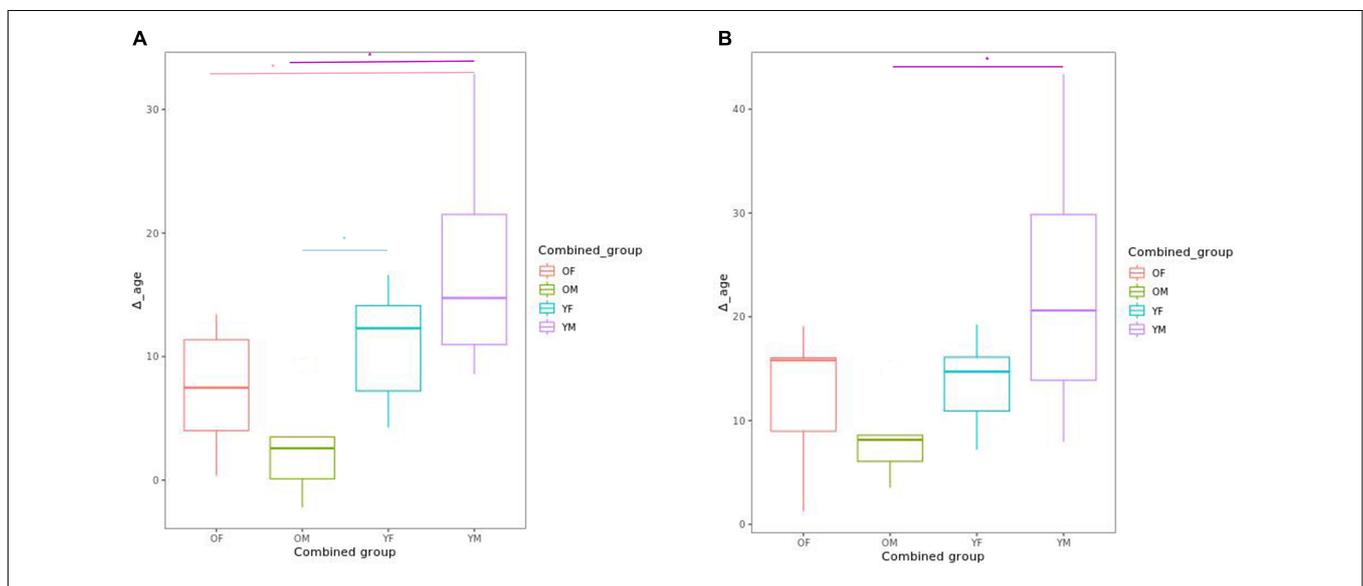


FIGURE 3 | Box plot showing the comparison of delta age (Δ_{age}) using (A) Hannum's clock and (B) Horvath's clock in the four groups generated according to the mean values of chronological age and years of CLZ treatment. Differences are observed between young patients with more or a few years of treatment vs. older patients with many years of treatment. The four groups analyzed were: young patients with few years of treatment (YF); young patients with many years of treatment (YM); older patients with few years of treatment (OF), and older patients with many years of treatment (OM). The asterisk (*) denotes significant differences.

TABLE 2 | Summary of the pathway enrichment for hypomethylated and hypermethylated sites.

Gene set	Pathway	Genes*	FDR	Enrichment ratio	No of genes found/expected
Hypomethylated					
hsa05213	Endometrial cancer	<i>AKT1, AKT2, APC, APC2, AXIN1, AXIN2, BAD, BAK1, BAX, BRAF</i>	2.4e-06	1.542	51/58
hsa03430	Mismatch repair	<i>EXO1, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PCNA, PMS2, POLD2, POLD3</i>	6.4e-03	1.525	20/23
hsa05226	Gastric cancer	<i>ABCB1, AKT1, AKT2, APC, APC2, AXIN1, AXIN2, BAK1, BAX, BCL2</i>	3.8e-12	1.494	127/149
hsa00532	Glycosaminoglycan biosynthesis	<i>B3GALT6, B3GAT3, B4GALT7, CHPF, CHPF2, CHST11, CHST12, CHST13, CHST14, CHST3</i>	1.9e-02	1.490	17/20
hsa05214	Glioma	<i>AKT1, AKT2, BAK1, BAX, BRAF, CALM1, CALM2, CALM3, CALML4, CALMK2B</i>	4.4e-06	1.482	60/71
hsa00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	<i>AMDHD2, CMAS, CYB5R1, CYB5R2, CYB5R3, CYB5R4, CYB5RL, FUK, GALE, GALK1</i>	3.9e-04	1.461	40/48
hsa04211	Longevity regulating pathway	<i>ADCY1- ADCY9, ADIPOR1, ADIPOR2, AKT1, AKT1S1, AKT2, APPL1, ATF2, ATF4, ATF6B</i>	1.1e-06	1.458	74/89
hsa04390	Hippo signaling pathway	<i>ACTB1, ACTG1, AJUBA, APC, APC2, AXIN1, AXIN2, BBC3, BIRC2, BIRC5</i>	3.2e-10	1.446	127/154
hsa03050	Proteasome	<i>ADRM1, POMP, PSMA1, PSMA3, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB10</i>	1.1e-03	1.442	37/45
hsa04370	VEGF signaling pathway	<i>AKT1, AKT2, BAD, CASP9, CDC42, HRAS, HSPB1, JMJD7-PLA2G4B, KDR, KRAS</i>	2.8e-04	1.426	48/59
Hypermethylated					
hsa02010	ABC transporters	<i>ABCA1, ABCA12, ABCA2, ABCA3, ABCA7, ABCB8, ABCB9, ABCC1, ABCC12, ABCC2</i>	1.6e-04	3.402	19/44
hsa04144	Endocytosis	<i>AGAP1, AP2A1, AP2A2, AP2B1, AP2M1, ARAP1, ARAP3, ARPC1B, ASAP1, ASAP2</i>	1.6e-04	1.873	244/58

*Only the top 10 genes of the top enriched pathways for differentially methylated sites between CLZ-treated patients and drug-naïve patients are shown. FDR, False discovery rate; No, number.

Mapping and Annotation of Genome-Wide Association Studies (GWAS)] (35) was used to prioritize and interpret GWAS results of the 307 annotated genes in this region. This analysis revealed top genes, such as *NOTCH4*, *MICA*, *TRIM27*, *PBX2*, and *FKBPL*, as enriched in GWAS of schizophrenia, CLZ-induced agranulocytosis/granulocytopenia in treatment-resistant schizophrenia, and bipolar disorder among other psychiatric and non-psychiatric conditions (**Supplementary Figure 2**). In this enrichment analysis of the differentially methylated regions, we did not find any pathway with a statistically significant association; nevertheless, in the nominal association, twelve pathways were identified (**Supplementary Figure 3**).

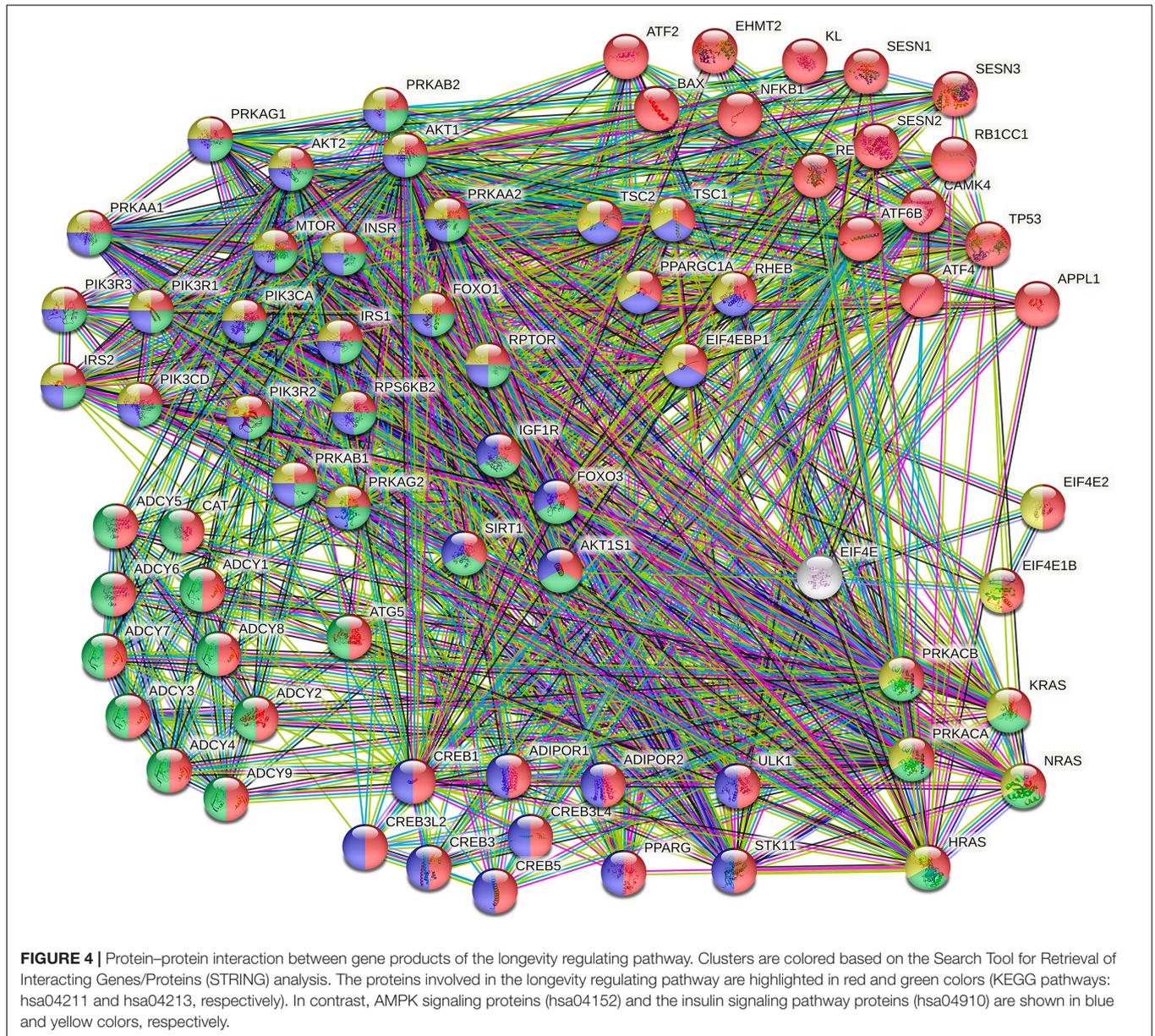
DISCUSSION

Various analyses of DNA methylome in CLZ-treated patients have been documented in European (36, 37) and Asiatic populations (38, 39). Herein, we report the first differential methylation analysis in a Latin American population between CLZ-treated patients with refractory psychosis and drug-naïve patients with psychiatric disorders. Our results showed that the proportion of hypomethylated CpG sites (87.7%) was much higher than hypermethylated ones (12.3%) in the CLZ-treated group. This finding agrees with previous studies that found a higher proportion of hypomethylated sites in patients with refractory schizophrenia treated with CLZ (40), and an

increase in the global DNA hypomethylation in leukocytes obtained from patients with schizophrenia who received CLZ (41). Additional studies have reported that CLZ induces DNA demethylation at the level of specific genes; for instance, evidence suggests that CLZ may attenuate the dysregulation of GABAergic and glutamatergic transmission by reducing gene promoter hypermethylation (42, 43). These findings raise CLZ as a potential drug that deserves further investigation and, based on the screening of new potential targets in CLZ, appears to be a promising strategy for drug repurposing.

On the other hand, our results showed that patients with psychosis treated with CLZ had a lower Δ age than those without psychopharmacological treatment. In addition, we found a significant reduction in the epigenetic age for the three studied clocks in the group of male patients; in this regard, a previous study observed the same effect of CLZ in reducing epigenetic age in male patients (23). Although the authors studied a larger sample of patients with schizophrenia in that study, they included very few CLZ users and did not perform differential methylation analysis. In this sense, the previous findings are consistent with ours. They suggested that treatment with CLZ could reduce epigenetic aging and directly impact the mortality of individuals treated with this antipsychotic.

Collectively, one of the pathways found to be hypomethylated was the estrogen signaling pathway, including the gene encoding for the estrogen receptor 1 (ESR1) (**Figure 3**). ESR1 is highly involved in estrogen metabolism, and differences in the frequency



of some of its genetic variants have been associated with longevity in humans (44, 45). The DNA methylation levels in this gene may explain the difference in epigenetic age reduction only in men. Estrogen levels in a mouse model treated with 17- α estradiol affected metabolic parameters and delayed aging in male mice (46, 47). If *CLZ* induces DNA hypomethylation, it will increase *ESR1* gene expression and estrogen sensitivity, which could fit in a hypothesis behind the significant epigenetic age reduction observed in our study. The longevity regulating pathway also appeared to be potentially involved in *CLZ*-induced epigenetic age changes. This is in line with epidemiological studies and a meta-analysis by Vermeulen et al. (48), which have reported that the long-term *CLZ* treatment is associated with an about 40% lower all-cause mortality compared with other antipsychotics (12, 15, 16, 49). In addition, we were able to identify enrichment of the membrane-bound adenylyl cyclase enzymes (also known

as adenylyl cyclases) in this pathway. Contradictorily, the hypomethylation of *ADCYs* genes would have a similar action to that reported when these genes are inhibited. For instance, the *Adcy5* knockout mouse lives longer and is used as a model of longevity (50–54). Taken together, our findings suggest that the regulation of the longevity pathway by *CLZ* action may promote epigenetic changes that need to be further explored. Interestingly, another group of genes found in the protein–protein interaction network analysis was related to AMP-activated protein kinases. The activation of this pathway has also been associated with longevity and aging delay (55–59).

Clozapine exhibits unique benefits for ameliorating symptoms in patients with treatment-resistant psychosis, for reducing suicide, and for improving longevity (18). This last characteristic has been observed in some epidemiological studies (14, 19, 20, 49), and in a recent study using age classifiers to drug-

induced transcriptomes that identified several geroprotectors, such as CLZ (60). Thus, despite lethal adverse reactions of CLZ, this molecule may have pro-longevity effects that should be further investigated.

Some limitations of this study should be considered. First, our sample size is small, however, this is the first study of CLZ effect on DNA methylome in Latin American patients with psychosis, and the number of CLZ-users included in other reports is still restricted and similar in numbers to ours (which is partly due to the misperception that CLZ is a dangerous therapeutic agent). Despite this, some of our results confirm previous findings from other recent studies. Second, our drug-naïve patients had different psychiatric disorders and were younger than CLZ-treated patients' group, which might influence the observed findings. Third, this is a cross-sectional study performed in a peripheral tissue, in which we did not evaluate other variables that may modulate epigenetic aging, such as prior pharmacological interventions or concomitant to CLZ that might impact DNA methylation. For instance, eight CLZ-treated patients were also receiving valproate, a drug that has been reported to be a potent epigenetic agent, affecting the DNA and histone methylation status (61). Nevertheless, due to a paucity of longitudinal epigenetic data of CLZ-treated patients, we believe that this is a good approach to evaluate the potential CLZ effects on the epigenome. In this study, we only evaluated DNA methylome, future longitudinal studies should confirm our findings and explore whether CLZ may be considered as an epigenetic drug. We could conclude that the long-term CLZ treatment might reduce epigenetic aging in male patients with psychotic disorders. In addition, our findings suggest a hypomethylation of genes of the longevity regulatory pathway as a potential action of CLZ. Thus, CLZ poses an exciting mechanism to be further explored to improve life expectancy and ameliorate the aging effects of patients treated with this antipsychotic.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data presented in the study are deposited in the GEO online repository, accession numbers GSE197136 and GSE201638.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Research and Bioethics Committees of Instituto

Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, the Ethics Committee of the Children's Psychiatric Hospital Dr. Juan N. Navarro with approval No. II3/01/0913, and the Ethics Committee of the National Institute of Genomic Medicine with approval No. 06/2018/I. Furthermore, all adult participants signed informed consent. For those patients under the age of 18 years, an informed assent letter was signed by both parents/guardians and the minor.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NM-J, ML-L, and HN: conceptualization, resources, and project administration. BP-A, DD-O, AO-V, CA-C, YM-L, ES, IJ-R, CT-Z, and TG-C: methodology. BP-A, JM-M, and AG-M: software. BP-A and JM-M: formal analysis and data curation. BP-A, YM-L, AO-V, DD-O, JM-M, AG-M, and ES-R: investigation. BP-A, JM-M, and NM-J: writing—original draft preparation. ES-R, HN, ML-L, and NM-J: writing—review and editing. ES-R, YM-L, AO-V, DD-O, JM-M, AG-M, BP-A, ES, IJ-R, CT-Z, TG-C, NM-J, ML-L, and HN: visualization. NM-J, ML-L, AG-M, and HN: supervision. NM-J, AG-M, ML-L, and HN: funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (grant no. 233695 to NM-J), the Fundación Gonzalo Río Arronte (grant no. S591 to AG-M), the Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) (grant no. 06/2018/I to HN), and Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco (grant no. 34605034 to ML-L). BP-A was a doctoral student from the Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud at Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico and was supported by CONACyT (grant No. 766012).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2022.870656/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Walker ER, McGee RE, Druss BG. Mortality in mental disorders and global disease burden implications: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. (2015) 72:334–41. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2014.2502
- Dregan A, McNeill A, Gaughran F, Jones PB, Bazley A, Cross S, et al. Potential gains in life expectancy from reducing amenable mortality among people diagnosed with serious mental illness in the United Kingdom. *PLoS One*. (2020) 15:e0230674. doi: 10.1371/journal.pone.0230674
- Hjorthøj C, Stürup AE, McGrath JJ, Nordentoft M. Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Psychiatry*. (2017) 4:295–301. doi: 10.1016/S2215-0366(17)30078-0
- Han LKM, Verhoeven JE, Tyrka AR, Penninx BWJH, Wolkowitz OM, Månsson KNT, et al. Accelerating research on biological aging and mental health: current challenges and future directions. *Psychoneuroendocrinology*. (2019) 106:293–311. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.04.004
- Rutherford BR, Taylor WD, Brown PJ, Sneed JR, Roose SP. Biological aging and the future of geriatric psychiatry. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. (2017) 72:343–52. doi: 10.1093/gerona/glw241

6. Wolkowitz OM. Accelerated biological aging in serious mental disorders. *World Psychiatry Off.* (2018) 17:144–5. doi: 10.1002/wps.20546
7. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell.* (2013) 49:359–67. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.016
8. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* (2013) 14:R115. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115
9. Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging.* (2018) 10:573–91. doi: 10.18632/aging.101414
10. Dada O, Adanty C, Dai N, Jeremian R, Alli S, Gerretsen P, et al. Biological aging in schizophrenia and psychosis severity: DNA methylation analysis. *Psychiatry Res.* (2021) 296:113646. doi: 10.1016/j.psychres.2020.113646
11. Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia, “just the facts” 5. Treatment and prevention. Past, present, and future. *Schizophr Res.* (2010) 122:1–23. doi: 10.1016/j.schres.2010.05.025
12. Soontornniyomkij V, Lee EE, Jin H, Martin AS, Daly RE, Liu J, et al. Clinical correlates of insulin resistance in chronic schizophrenia: relationship to negative symptoms. *Front Psychiatry.* (2019) 10:251. doi: 10.3389/fpsy.2019.00251
13. Khan SS, Singer BD, Vaughan DE. Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell.* (2017) 16:624–33. doi: 10.1111/acel.12601
14. Schneider-Thoma J, Efthimiou O, Huhn M, Krause M, Reichelt L, Röder H, et al. Second-generation antipsychotic drugs and short-term mortality: a systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomised controlled trials. *Lancet Psychiatry.* (2018) 5:653–63. doi: 10.1016/S2215-0366(18)30177-9
15. Meyer JM, Nasrallah HA, McEvoy JP, Goff DC, Davis SM, Chakos M, et al. The clinical antipsychotic trials of intervention effectiveness (CATIE) Schizophrenia trial: clinical comparison of subgroups with and without the metabolic syndrome. *Schizophr Res.* (2005) 80:9–18. doi: 10.1016/j.schres.2005.07.015
16. Torniaainen M, Mittendorfer-Rutz E, Tanskanen A, Björkenstam C, Suvisaari J, Alexanderson K, et al. Antipsychotic treatment and mortality in schizophrenia. *Schizophr Bull.* (2015) 41:656–63. doi: 10.1093/schbul/sbu164
17. Nucifora FC, Mihaljevic M, Lee BJ, Sawa A. Clozapine as a model for antipsychotic development. *Neurotherapeutics.* (2017) 14:750–61. doi: 10.1007/s13311-017-0552-9
18. Farooq S, Taylor M. Clozapine: dangerous orphan or neglected friend? *Br J Psychiatry.* (2011) 198:247–9. doi: 10.1192/bjp.bp.110.088690
19. Cho J, Hayes RD, Jewell A, Kadra G, Shetty H, MacCabe JH, et al. Clozapine and all-cause mortality in treatment-resistant schizophrenia: a historical cohort study. *Acta Psychiatr Scand.* (2019) 139:237–47. doi: 10.1111/acps.12989
20. Hayes RD, Downs J, Chang CK, Jackson RG, Shetty H, Broadbent M, et al. The effect of clozapine on premature mortality: an assessment of clinical monitoring and other potential confounders. *Schizophr Bull.* (2015) 41:644–55. doi: 10.1093/schbul/sbu120
21. Alessandro G, Erbo D, Grayson DR. Epigenetic basis of clozapine action. *J Drug Des Res.* (2017) 4:1055.
22. Dong E, Locci V, Gatta E, Grayson DR, Guidotti A. N-Phthalyl-L-tryptophan (RG108), like clozapine (CLO), induces chromatin remodeling in Brains of prenatally stressed mice. *Mol Pharmacol.* (2019) 95:62–9. doi: 10.1124/mol.118.113415
23. Higgins-Chen AT, Boks MP, Vinkers CH, Kahn RS, Levine ME. Schizophrenia and epigenetic aging biomarkers: increased mortality, reduced cancer risk, and unique clozapine effects. *Biol Psychiatry.* (2020) 88:224–35. doi: 10.1016/j.biopsych.2020.01.025
24. Tian Y, Morris TJ, Webster AP, Yang Z, Beck S, Feber A, et al. ChAMP: updated methylation analysis pipeline for illumina beadchips. *Bioinforma Oxf Engl.* (2017) 33:3982–4. doi: 10.1093/bioinformatics/bt x513
25. Teschendorff AE, Marabita F, Lechner M, Bartlett T, Tegner J, Gomez-Cabrero D, et al. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in illumina infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinforma Oxf Engl.* (2013) 29:189–96. doi: 10.1093/bioinformatics/bts 680
26. Xu Z, Niu L, Li L, Taylor JA. ENmix: a novel background correction method for illumina humanmethylation450 beadchip. *Nucleic Acids Res.* (2016) 44:e20. doi: 10.1093/nar/gkv907
27. Houseman EA, Accomando WP, Koestler DC, Christensen BC, Marsit CJ, Nelson HH, et al. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics.* (2012) 13:86. doi: 10.1186/1471-2105-13-86
28. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* (2015) 43:e47. doi: 10.1093/nar/gkv007
29. Butcher LM, Beck S. Probe lasso: a novel method to rope in differentially methylated regions with 450K DNA methylation data. *Methods.* (2015) 72:21–8. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.10.036
30. Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47:W199–205. doi: 10.1093/nar/gkz401
31. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47:D607–13. doi: 10.1093/nar/gky1131
32. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* (2003) 13:2498–504. doi: 10.1101/gr.1239303
33. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* (2017) 45:D353–61. doi: 10.1093/nar/gkw1092
34. Nolasco-Rosales GA, Martínez-Magaña JJ, Juárez-Rojop IE, González-Castro TB, Tovilla-Zarate CA, García AR, et al. Association study among comethylation modules, genetic polymorphisms and clinical features in mexican teenagers with eating disorders: preliminary results. *Nutrients.* (2021) 13:3210. doi: 10.3390/nu13093210
35. Watanabe K, Taskesen E, van Bochoven A, Posthuma D. Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. *Nat Commun.* (2017) 8:1826. doi: 10.1038/s41467-017-01261-5
36. Gillespie A, Hannon E, Dempster E, Collier D, Egerton A, Mill J, et al. T50 – longitudinal epigenetic analysis of clozapine use in treatment-resistant schizophrenia: data from the crestar consortium. *Eur Neuropsychopharmacol.* (2017) 27:S463–4. doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.09.538
37. Hannon E, Dempster EL, Mansell G, Burrage J, Bass N, Bohlken MM, et al. DNA methylation meta-analysis reveals cellular alterations in psychosis and markers of treatment-resistant schizophrenia. *Elife.* (2021) 10:e58430. doi: 10.7554/eLife.58430
38. Lee MK, Hong Y, Kim SY, London SJ, Kim WJ. DNA methylation and smoking in Korean adults: epigenome-wide association study. *Clin Epigenetics.* (2016) 8:103. doi: 10.1186/s13148-016-0266-6
39. Okazaki S, Otsuka I, Numata S, Horai T, Mouri K, Boku S, et al. Epigenetic clock analysis of blood samples from Japanese schizophrenia patients. *NPJ Schizophr.* (2019) 5:4. doi: 10.1038/s41537-019-0072-1
40. Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Yamamori H, Yasuda Y, et al. Effect of clozapine on DNA methylation in peripheral leukocytes from patients with treatment-resistant schizophrenia. *Int J Mol Sci.* (2017) 18:632. doi: 10.3390/ijms18030632
41. Melas PA, Rogdaki M, Ösby U, Schalling M, Lavebratt C, Ekström TJ. Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset. *FASEB J.* (2012) 26:2712–8. doi: 10.1096/fj.11-202069
42. Dong E, Tueting P, Matrisciano F, Grayson DR, Guidotti A. Behavioral and molecular neuroepigenetic alterations in prenatally stressed mice: relevance for the study of chromatin remodeling properties of antipsychotic drugs. *Transl Psychiatry.* (2016) 6:e711. doi: 10.1038/tp.2015.191
43. Seo MK, Kim YH, McIntyre RS, Mansur RB, Lee Y, Carmona NE, et al. Effects of antipsychotic drugs on the epigenetic modification of brain-derived neurotrophic factor gene expression in the hippocampi of chronic restraint stress rats. *Neural Plast.* (2018) 2018:2682037. doi: 10.1155/2018/2682037
44. Corbo RM, Ulizzi L, Positano L, Scacchi R. Association of CYP19 and ESR1 pleiotropic genes with human longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* (2011) 66:51–5. doi: 10.1093/gerona/gql160

45. Han B, Chen H, Yao Y, Liu X, Nie C, Min J, et al. Genetic and non-genetic factors associated with the phenotype of exceptional longevity & normal cognition. *Sci Rep.* (2020) 10:19140. doi: 10.1038/s41598-020-75446-2
46. Garratt M, Lagerborg KA, Tsai YM, Galecki A, Jain M, Miller RA. Male lifespan extension with 17- α estradiol is linked to a sex-specific metabolomic response modulated by gonadal hormones in mice. *Aging Cell.* (2018) 17:e12786. doi: 10.1111/acel.12786
47. Mann SN, Hadad N, Nelson Holte M, Rothman AR, Sathiaseelan R, Ali Mondal S, et al. Health benefits attributed to 17 α -estradiol, a lifespan-extending compound, are mediated through estrogen receptor α . *Elife.* (2020) 9:e59616. doi: 10.7554/eLife.59616
48. Vermeulen JM, van Rooijen G, van de Kerkhof MPJ, Sutterland AL, Correll CU, de Haan L. Clozapine and long-term mortality risk in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of studies lasting 1.1-12.5 years. *Schizophr Bull.* (2019) 45:315-29. doi: 10.1093/schbul/sb052
49. Taipale H, Tanskanen A, Mehtälä J, Vattulainen P, Correll CU, Tiihonen J. 20-year follow-up study of physical morbidity and mortality in relationship to antipsychotic treatment in a nationwide cohort of 62,250 patients with schizophrenia (FIN20). *World Psychiatry.* (2020) 19:61-8. doi: 10.1002/wps.20699
50. De Lorenzo MS, Chen W, Baljinnyam E, Carlini MJ, La Perle K, Bishop SP, et al. Reduced malignancy as a mechanism for longevity in mice with adenylyl cyclase type 5 disruption. *Aging Cell.* (2014) 13:102-10. doi: 10.1111/acel.12152
51. Vatner SF, Pachon RE, Vatner DE. Inhibition of adenylyl cyclase type 5 increases longevity and healthful aging through oxidative stress protection. *Oxid Med Cell Longev.* (2015) 2015:250310. doi: 10.1155/2015/250310
52. Vatner SF, Yan L, Ishikawa Y, Vatner DE, Sadoshima J. Adenylyl cyclase type 5 disruption prolongs longevity and protects the heart against stress. *Circ J.* (2009) 73:195-200. doi: 10.1253/circj.cj-08-0957
53. Yan L, Park JY, Dillinger JG, De Lorenzo MS, Yuan C, Lai L, et al. Common mechanisms for calorie restriction and adenylyl cyclase type 5 knockout models of longevity. *Aging Cell.* (2012) 11:1110-20. doi: 10.1111/acel.12013
54. Yan L, Vatner DE, O'Connor JP, Ivessa A, Ge H, Chen W, et al. Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell.* (2007) 130:247-58. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.038
55. Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev.* (2004) 18:3004-9. doi: 10.1101/gad.1255404
56. Burkewitz K, Weir HJM, Mair WB. AMPK as a pro-longevity target. *Exp Suppl.* (2016) 107:227-56. doi: 10.1007/978-3-319-43589-3_10
57. Greer EL, Banko MR, Brunet A. AMP-activated protein kinase and FoxO transcription factors in dietary restriction-induced longevity. *Ann N Y Acad Sci.* (2009) 1170:688-92. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04019.x
58. Morgunova GV, Klebanov AA. Age-related AMP-activated protein kinase alterations: from cellular energetics to longevity. *Cell Biochem Funct.* (2019) 37:169-76. doi: 10.1002/cbf.3384
59. Stancu AL. AMPK activation can delay aging. *Discov Craiova Rom.* (2015) 3:e53. doi: 10.15190/d.2015.45
60. Janssens GE, Lin XX, Millan-Ariño L, Kavšek A, Sen I, Seinsträ RI, et al. Transcriptomics-based screening identifies pharmacological inhibition of Hsp90 as a means to defer aging. *Cell Rep.* (2019) 27:467-80.e. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.044
61. Mello MLS. Sodium valproate-induced chromatin remodeling. *Front Cell Dev Biol.* (2021) 9:645518. doi: 10.3389/fcell.2021.645518

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

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Pérez-Aldana, Martínez-Magaña, Mayén-Lobo, Dávila-Ortiz de Montellano, Aviña-Cervantes, Ortega-Vázquez, Genis-Mendoza, Sarmiento, Soto-Reyes, Juárez-Rojop, Tovilla-Zarate, González-Castro, Nicolini, López-López and Monroy-Jaramillo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXO VI

 Women in
Bioinformatics
& Data Science LA
Poster by collaboration among members

POSTER PRESENTATION CERTIFICATE

The WBDS LA Executive Board certifies that

Blanca Estela Pérez Aldana

has presented a poster at the

2nd Conference of Women in Bioinformatics and Data Science LA

held virtually from 22nd to 24th September, 2021


WBDS LA Executive Board
Ana Julia Velez Rueda


WBDS LA Executive Board
Lucy Jimenez


WBDS LA Executive Board
Lilliane Conteville

  SPYDER  mumuki  CABANA  AIG

ANEXO VI



Blanca Pérez, José Jaime Martínez-Magaña, Yerye Gibrán Mayén-Lobo, David José Dávila-Ortiz de Montellano, Carlos Luis Aviña-Cervantes, Alberto Ortega-Vázquez, Alma Delia Genis-Mendoza, Emanuel Sarmiento, Ernesto Soto-Reyes Solís, Isela Esther Juárez-Rojop, Carlos Alfonso Tovilla-Zarate, Thelma Beatriz Gonzalez-Castro, Humberto Nicolini, Marisol López-López, Nancy Monroy-Jaramillo

Are hereby presented this certificate of recognition for presenting the poster titled,

Clozapine Might Reduce Epigenetic Age Putatively by Hypomethylation of Longevity Regulatory Pathways Genes

**For the 2021 Virtual World Congress of Psychiatric Genetics
October 11 – October 15, 2021**

Jordan Smoller, M.D., Sc.D.
President, ISPG

Acti
ve a

ANEXO VI



**AMGH**
ASOCIACIÓN MEXICANA
DE GENÉTICA HUMANA

LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE GENÉTICA HUMANA A.C.
Otorga la presente

CONSTANCIA

Al trabajo libre

Impacto de la clozapina sobre la reducción de la edad epigenética mediante la hipometilación de genes que intervienen en la vía de la longevidad. presentado en modalidad Virtual en el XLVI Congreso Nacional de Genética Humana, modalidad híbrida, el 12 de noviembre de 2021.

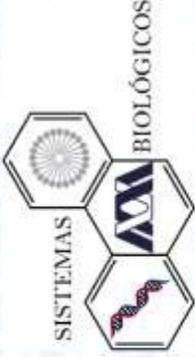
Autor(es): Blanca Estela Pérez Aldana. José Jaime Martínez Magaña. Yerye Gibrán Mayén Lobo. David José Dávila Ortiz de Montellmo. Carlos Luis Aviña Cervantes. Alberto Ortega Vázquez. Alma Delia Genis Mendoza. Emanuel Sarmiento. Ernesto Soto Reyes Solís. Isela Esther Juárez Rojop. Carlos Alfonso Tovilla Zarate. Thelma Beatriz Gonzalez Castro. Humberto Nicolini. Marisol López López. Nancy Monroy Jaramillo

Folio: DCJQ3V2J51NUEE7OW4NQ


Dr. José Elías García Ortiz
Presidente

Act
Ver a

ANEXO VI



DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
Jefaturas de Áreas de Investigación

Otorgan la presente **CONSTANCIA** a:

Blanca Estela Pérez Aldana, Luis Enrique Hernández Reyes, Alberto Ortega Vázquez, Ernesto Soto Reyes, Nancy Monroy Jaramillo, Marisol López López

Por presentar el cartel titulado

“ANÁLISIS DE LA LONGITUD TELOMÉRICA Y NÚMERO DE COPIAS DE DNA MITOCONDRIAL EN PACIENTES CON TRASTORNOS PSICÓTICOS”

En el IX Congreso del Departamento de Sistemas Biológicos
Realizado en la Ciudad de México, los días 13 y 14 de octubre de 2022


Dr. Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos


M en C Alejandro Palma Ramos,
Jefe del Área de Productos Biológicos

Activar Windows
Ver la configuración para activar W