



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
“SALVADOR ZUBIRÁN”**

**¿ES POSIBLE MEJORAR EL PODER PREDICTIVO DE LAS
ESCALAS DE MORTALIDAD USANDO LA EDAD
FENOTÍPICA EN LUGAR DE LA CRONOLÓGICA?**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN
MEDICINA INTERNA

PRESENTA:

DR. FRANCISCO EDUARDO DARDÓN FIERRO

TUTOR DE TESIS:

DR. LUIS ADRIÁN SOTO MOTA

Ciudad Universitaria, CD. MX. Octubre del 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tesis: ¿Es posible mejorar el poder predictivo de las escalas de mortalidad usando la edad fenotípica en lugar de la cronológica?

Presenta: Dr. Francisco Eduardo Dardón Fierro



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
DR. "SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA

Dr. Sergio Ponce de León Rosales
Director de Enseñanza del INCMNSZ

Dr. Alfonso Gulias Herrero
Subdirector de Servicios Médicos del INCMNSZ
Profesor titular del curso de Medicina Interna del INCMNSZ

Dr. Luis Adrián Soto Mota
Investigador en ciencias médicas "C" adscrito a la unidad de investigación de enfermedades metabólicas del INCMNSZ
Tutor de tesis

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo incondicional, eterno, completo e incesante.

A Araceli por ser faro, timón y ancla.

A Dios, por no dejarme parar.

Índice

1. Índice.....	4
2. Resumen.....	5
3. Antecedentes	5
4. Justificación.....	6
5. Marco teórico.....	7
6. Objetivo	9
7. Diseño del estudio	9
8. Consideraciones éticas.....	10
9. Análisis estadístico	10
10. Resultados	11
11. Discusión.....	14
12. Limitaciones	15
13. Conclusiones.....	15
14. Referencias bibliográficas.....	16

Resumen

Antecedentes: Los cambios epigenéticos del ácido desoxirribonucleico (ADN), particularmente la metilación, pueden modificar el fenotipo de un individuo sin alterar su genotipo. El estudio de estos cambios ha permitido desarrollar relojes epigenéticos que se relacionan estrechamente con desenlaces de morbimortalidad, así como el cálculo de una edad basada en estos cambios, la edad fenotípica. Las escalas de riesgo de mortalidad comúnmente utilizan la edad cronológica como uno de los valores para su cálculo, por lo que se realizó este estudio para determinar si el utilizar la edad fenotípica en lugar de la cronológica permite mejorar la capacidad predictiva de las mismas.

Material y métodos: Se realizó un estudio retrospectivo observacional analizando 97 expedientes y exámenes de laboratorio de pacientes ingresados a la unidad de cuidados intensivos (UCI) de un hospital de tercer nivel con el diagnóstico de infección grave por SARS-CoV-2, calculando para todos la edad fenotípica y posteriormente las escalas de riesgo Low-Harm, Nutri-CoV, APACHE II y SAPS II mediante la edad cronológica y la edad fenotípica.

Análisis estadístico: Se obtuvieron las áreas bajo la curva de curvas ROC (*Receiver operating characteristic*) de todas las escalas y se compararon mediante la prueba de DeLong. Asimismo se calcularon valores predictivos positivo (VPP), negativo (VPN) y precisión balanceada.

Resultados: Las áreas bajo la curva ROC no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre escalas, sin embargo, los valores del VPP y la precisión balanceada mejoraron en 3/4 escalas evaluadas.

Conclusión: La utilización de la edad fenotípica podría ser útil para disminuir la tasa de falsos positivos en 3/4 escalas evaluadas y mejorar su utilidad clínica.

Antecedentes

La metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) es la modificación epigenética más ampliamente estudiada hasta el momento, siendo capaz de cambiar el fenotipo de un individuo sin alterar el genotipo. En múltiples sitios del genoma humano la

heterogeneidad del grado de metilación varía con la edad cronológica, siendo la base sobre la cual se han desarrollado diversos relojes epigenéticos capaces de predecir la edad del sujeto y correlacionar también con desenlaces de morbimortalidad¹. En las células eucariotas, la modificación epigenética más común es la metilación de sitios de citosina que preceden a un nucleótido guanina (sitios CpG), evitando que factores de transcripción se unan a regiones promotoras y de esta manera suprimiendo la expresión génica. Es por esto que en el desarrollo de los relojes epigenéticos es común que sean estos sitios de metilación los que son estudiados. Algunos de los desenlaces con los que la edad biológica calculada mediante la medición del grado de metilación de estos sitios ha sido correlacionada van desde enfermedad cardiovascular, consumo de tabaco, obesidad, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, entre otras².

Dentro de los cuidados críticos, se han desarrollado escalas desde hace más de 30 años que permiten estimar la gravedad del estado del paciente así como la mortalidad intrahospitalaria del mismo. Todas estas incorporan diferentes variables como son enfermedades preexistentes, valores bioquímicos y/o hematológicos, alteraciones fisiológicas en diferentes órganos y la edad del paciente³. Para calcular estas se ha utilizado siempre la edad cronológica, por lo que a partir del conocimiento actual que tenemos acerca de la correlación de la epigenética con los estados morbosos es que surge la pregunta: ¿Podrá ser posible mejorar la precisión escalas pronósticas utilizando la edad biológica calculada en lugar de la edad cronológica en su cálculo?

Justificación

Hasta el momento se desconoce si las escalas pronósticas comúnmente utilizadas para predecir desenlaces en pacientes críticos pueden ser mejoradas mediante el cálculo de la edad epigenética y su incorporación al momento de obtener las primeras, por lo que de ser así, se trataría de una intervención de bajo costo que podría utilizarse para mejorar la capacidad predictiva de las mismas.

Marco teórico

Durante la evolución de los cuidados críticos, se han desarrollado múltiples escalas pronósticas creadas con el objetivo de predecir mortalidad u otros desenlaces relacionados en los pacientes ingresados a una unidad de terapia intensiva. A mediados de la década de los 80 se publicó la escala APACHE (*Acute physiology and chronic health evaluation*)⁴, una de las primeras escalas diseñadas con el fin de obtener un pronóstico en pacientes críticos y que actualmente aún es ampliamente utilizada en alguna de sus versiones posteriores^{5,6,7}.

Asimismo, existen otras escalas que asisten en la evaluación pronóstica como SAPS (*simplified acute physiology score*)⁸, la cual también tuvo una actualización posterior⁹. Recientemente y a raíz de la crisis sanitaria creada por la pandemia respiratoria derivada del virus SARS-CoV-2, se han desarrollado escalas validadas en cohortes de pacientes con esta enfermedad; este es el caso de la escala low-harm¹⁰ utilizada para predecir mortalidad, o de la escala Nutri-CoV¹¹, que permite predecir mortalidad y gravedad del cuadro generado por la infección. Ninguna escala es perfecta en su poder predictivo, y esta es un área en continuo proceso de mejoramiento.

Todas las escalas previamente mencionadas incluyen la edad cronológica del paciente dentro de los parámetros a evaluar; sin embargo, paralelamente se ha puesto de relieve de manera reciente la importancia que reviste la utilización de ciertos biomarcadores para establecer la “edad biológica” de un individuo, que correlaciona mejor con morbilidad y mortalidad que la edad cronológica. Entre estos, se han descrito el daño genómico con acortamiento telomérico e inestabilidad cromosómica, daño mitocondrial por especies reactivas de oxígeno con disfunción de las mismas, alteraciones en las vías de señalización de insulina y factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) y por último, alteraciones en el epigenoma¹². Las primeras observaciones de este último marcador fueron realizadas en salmones jorobados, en donde se notó que los niveles de 5-metilcitosina (5mC) disminuían

progresivamente con la edad, observación que posteriormente pudo ser extendida a mamíferos^{13,14}. Dentro de la misma línea, se ha comparado el nivel de metilación de dinucleótidos citosina-fosfato-guanina de células CD4⁺ entre centenarios y recién nacidos, observándose hipometilación de estas regiones en los primeros que se extendía a todos los compartimientos genéticos (intrones, exones, promotores y regiones intergénicas)¹⁵. Esto motivó la pregunta sobre si era posible predecir la edad de un individuo a través de la medición de áreas hipometiladas, por lo que en 2013 Florath et al. estudiaron >480,000 sitios CpG en sangre completa de 965 participantes de 50-75 años, encontrando 162 sitios fuertemente correlacionados con la edad cronológica de los sujetos¹⁶. En ese mismo año, Horvath publicó un artículo en el cual analizó 8000 muestras de 51 diferentes células y tejidos sanos, identificando 393 sitios CpG que podían predecir la edad de los sujetos con una correlación de 0.96 y un error de 3.6 años, independientemente del tejido¹⁷. Asimismo, Hannum et al. publicaron un modelo predictivo derivado del análisis de 485,577 sitios CpG, utilizando 71 de estos para predecir la edad cronológica con una correlación del 96% y error de 3.6 años, validándose este en una segunda cohorte con similar correlación entre la predicción y la edad cronológica¹⁸. Un año después, Weidner et al. describieron que en sangre era posible reducir el número de sitios CpG para predecir la edad del individuo a sólo 3, con una desviación media absoluta de sólo 5 años¹⁹.

En 2018, Levine y colaboradores publicaron una herramienta que a través de la introducción de variables clínicas y de laboratorio de fácil acceso y bajo costo, permite calcular la edad fenotípica de un paciente dado con muy buena correlación con la edad cronológica ($r=0.94$), y a partir de aquella y su afinamiento con datos preexistentes de ADN metilado (ADNm) en sangre crearon el *DNAm PhenoAge*, una nueva herramienta cuya diferencia con la edad cronológica del sujeto de estudio se demostró correlacionaba de manera fuerte con mortalidad por todas las causas así como con diferentes causas de morbilidad²⁰.

Por su parte, recientemente McCrory et al. asociaron algunos de estos relojes con desenlaces clínicos y mortalidad así como uno de su propia creación (*GrimAgeAA*), encontrando que los relojes previamente descritos por Horvath y Hannum no fueron predictivos de la salud del individuo, mientras que el DNAm *PhenoAge* se asoció con 4 de 9 de los desenlaces estudiados en modelos mínimamente ajustados, mas no cuando se ajustó para otros factores sociales y de estilo de vida. Por su parte, *GrimAgeAA* se asoció con 8/9 desenlaces estudiados en modelos mínimamente ajustados, y permaneció asociado de manera significativa a velocidad de caminata, polifarmacia, fragilidad y mortalidad en modelos plenamente ajustados²¹.

Hasta el momento, no se ha estudiado si la utilización de la edad obtenida mediante la herramienta de la edad fenotípica en lugar de la edad cronológica mejora el poder predictivo de las escalas de mortalidad para pacientes ingresados a un área de terapia intensiva.

Objetivo

Determinar si el ajustar algunas escalas predictivas en pacientes críticamente enfermos por COVID-19 grave mediante el uso de la edad calculada por edad fenotípica mejora su capacidad predictiva.

Diseño del estudio

Estudio retrospectivo observacional realizado mediante búsqueda en el registro electrónico de expedientes de nuestra Institución de pacientes con diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 grave que requirieron admisión a un área de cuidados críticos por esta causa en un hospital de tercer nivel, en el periodo comprendido entre el primero de julio de 2020 al 31 de enero de 2021. Se obtuvieron 97 expedientes, de los cuales se recabó la siguiente información:

- a) Sexo
- b) Edad cronológica

- c) Comorbilidades
- d) Fecha de ingreso a la unidad de cuidados críticos
- e) Fecha de egreso de la unidad de cuidados críticos (o de muerte, en su caso)
- f) Fecha de egreso de hospitalización
- g) Desenlace (vivió o falleció)

Con los datos demográficos y algunos exámenes laboratoriales solicitados durante su estancia hospitalaria se calculó la edad fenotípica y se calcularon también las escalas de riesgo APACHE II, Nutri-CoV, Low-Harm y SAPS II utilizando tanto edad cronológica como edad fenotípica.

Consideraciones éticas

Para la realización de este estudio se solicitó la aprobación del comité de ética de este Instituto. Todas las revisiones de los expedientes se realizaron en el archivo clínico electrónico, los datos obtenidos de los expedientes fueron manejados con absoluta confidencialidad, los datos de las pacientes no son conocidos más que por los autores de este estudio.

Análisis estadístico

Se realizaron curvas ROC (*Receiver operating characteristic*) para cada escala tanto con edad cronológica como con edad fenotípica con los datos de los 97 pacientes y posteriormente se compararon las áreas bajo la curva mediante la prueba de DeLong. Asimismo, se obtuvieron valores predictivos positivos (VPP), valores predictivos negativos (VPN) y precisión balanceada a través de matriz de confusión con los puntos de corte establecidos en los respectivos estudios de validación de las escalas utilizadas. El análisis fue realizado con el programa R versión 4.0.3 usando los paquetes `library(dplyr)`, `library(blandr)`, `library(devtools)`, `library(caret)`, `library(readxl)`, `library(pROC)`, `library(lme4)`, `library(lmtest)`.

Resultados

Las características de los 97 pacientes estudiados incluyendo sexo, edad cronológica, edad fenotípica, días de estancia en unidad de cuidados intensivos (UCI), días de estancia intrahospitalaria y comorbilidades se encuentran reportadas en la tabla 1. El rango de edad cronológica se encontró entre 19-85 años, con predominio de sexo masculino en esta cohorte (70 hombres vs 27 mujeres). La mediana de estancia en UCI para sobrevivientes fue de 14 días vs 13.5 días para no sobrevivientes, y las comorbilidades más comunes fueron obesidad (40/97), diabetes mellitus 2 (DM2, 37/97) e hipertensión arterial sistémica (HAS, 33/97).

En la comparación de las curvas ROC mediante la prueba de DeLong no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el valor de p en ninguna de las escalas al valorar la edad fenotípica contra la edad cronológica (Low-Harm $p=0.20$, Nutri-CoV $p=0.69$, APACHE II $p=0.67$, SAPS II $p=0.71$, tabla 2). No obstante, al comparar los valores absolutos encontrados de VPP, VPN y precisión balanceada, se encontraron diferencias entre los valores calculados mediante edad cronológica contra edad fenotípica en las 4 escalas, siendo estas particularmente notorias en los VPP de las escalas Low-Harm, APACHE II y SAPS II (0.85 vs 1, 0.38 vs 0.67 y 0.08 vs 0.35) y en la precisión balanceada de las escalas Low-Harm y SAPS II (0.60 vs 0.68 y 0.57 vs 0.67, respectivamente).

Característica	Sobrevivientes	No sobrevivientes
Total (Mujeres/hombres)	63 (19/44)	34 (8/26)
Rango edad cronológica (mediana – rango intercuartílico)	19 – 78 (61 – 17)	36 – 85 (61.5 – 14)
Rango edad fenotípica (mediana – rango intercuartílico)	42-8 – 123.8 (89.4 – 24)	52.7 – 123.8 (92.9 – 20.2)
Mediana de días de estancia en UCI	14	13.5
Días de estancia intrahospitalaria	20	NA
Prediabetes	1	1
Diabetes mellitus 2	26	11
Hipertensión arterial sistémica	20	13
Hipotiroidismo	1	0
Sobrepeso	12	10
Obesidad	27	13
Grado 1	14	8
Grado 2	10	1
Grado 3	1	1
Mórbida	2	3
Cardiopatía isquémica	0	2
Enfermedad renal crónica	0	1
Dislipidemia	3	1
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	1	1
Asma	2	0
VIH	0	1
Cáncer	1	0

Neumoconiosis	1	0
Gota	1	1
Miastenia gravis	1	0
Leucemia mieloide crónica	0	1
Epilepsia	0	2
SAHOS	0	3

Tabla 1. Características de los pacientes incluidos en el estudio.

	Edad utilizada	Low-Harm	Nutri-CoV	APACHE II	SAPS II
AUROC	Edad cronológica	0.75	0.51	0.74	0.71
	Edad fenotípica	0.71	0.50	0.73	0.70
Valor de p		0.20	0.69	0.67	0.71
	Edad cronológica	0.85	0.70	0.38	0.08
VPP	Edad fenotípica	1	0.70	0.67	0.35
	Edad cronológica	0.33	0.31	0.87	0.95
VPN	Edad fenotípica	0.09	0.26	0.71	0.88
	Edad cronológica	0.60	0.51	0.67	0.57
PRECISIÓN BALANCEADA	Edad fenotípica	0.68	0.48	0.68	0.67
	Edad cronológica				

Tabla 2. Comparación de área bajo la curva (AUC), valor de p por prueba de DeLong, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y precisión balanceada obtenidos mediante cálculo de las 4 escalas analizadas utilizando edad fenotípica y edad cronológica.

Discusión

En la realización de este estudio se utilizaron múltiples escalas de riesgo derivadas en cohortes y contextos clínicos diversos; como quedó demostrado en 1999 por Lee et al., en ocasiones las escalas de riesgo ameritan ajustes locales debido a la dependencia de su resultado del contexto en el cual están siendo evaluadas²². Para el cálculo de muchas de las escalas de riesgo comúnmente utilizadas se utiliza la edad cronológica, y como ya quedó demostrado también mediante el estudio de la epigenética, la edad cronológica a menudo es un mal marcador del estado general de salud del individuo en cuestión^{1,2,16,17,18}, por lo que podría impactar en el cálculo del riesgo volviéndolo menos confiable. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio era valorar si con las herramientas actuales para cálculo de edad epigenética²⁰ se podía mejorar la capacidad predictiva de diferentes escalas de riesgo mediante una intervención de bajo costo.

Si bien las áreas bajo la curva ROC no tuvieron diferencias estadísticamente significativas, tenemos que tener en cuenta que no todos los errores cometidos mediante el cálculo inexacto de riesgo mediante escalas pueden suponer el mismo grado de gravedad, particularmente si aquel pudiera llegar a privar a un paciente de acceso a un área de cuidados críticos de la cual se hubiera beneficiado debido a que resultó en una probabilidad de fallecer más elevada de la que en realidad tenía. Partiendo de lo anterior, es importante resaltar que las curvas ROC no son la mejor manera de comparar la probabilidad de cometer el error de cálculo que pudiera perjudicar al paciente en cuestión, en este caso una probabilidad de mortalidad calculada mayor a la real que pudiera evitar su ingreso en un área de cuidados críticos. En este caso, el error a evitar con mayor cuidado sería el tener resultados falsamente positivos para mortalidad elevada mediante el cálculo de la escala en cuestión, por lo que el hecho de que el VPP haya mejorado al utilizar la edad fenotípica en lugar de la cronológica en 3 de las 4 escalas evaluadas deja entrever que probablemente esta intervención pueda disminuir la probabilidad de que un resultado falsamente positivo evite el ingreso de un paciente a un área de cuidados

intensivos de la cual podría beneficiarse. Asimismo, se realizó el cálculo de la precisión balanceada, en la cual mediante la utilización de la edad fenotípica pudimos observar mejoría en 3 de las 4 escalas evaluadas, siendo hasta del 10% el aumento de la misma en el caso de la escala SAPS II, indicando que el desempeño de las escalas al ser utilizadas con la edad fenotípica en lugar de la cronológica puede ser superior al brindarnos también un mejor balance entre sensibilidad y especificidad.

Limitaciones

Una de las limitaciones encontradas en este estudio es el hecho de que los pacientes fueron reclutados de manera posterior al inicio generalizado de tratamiento con dexametasona en los casos de infección por SARS-CoV-2 grave²³, mientras que las escalas utilizadas fueron todas propuestas y validadas de manera previa a la publicación del estudio RECOVERY. Asimismo, otra limitación es el hecho de que la muestra fue reclutada en un solo centro y que el tamaño pequeño de la misma pueda limitar su poder, por lo que se requiere idealmente de realizar una evaluación prospectiva y multicéntrica para confirmar los hallazgos encontrados en este estudio.

Conclusiones

La utilización de la edad fenotípica en lugar de la cronológica para el cálculo de escalas de riesgo puede mejorar el poder predictivo de las mismas, disminuyendo particularmente la tasa de falsos positivos y pudiendo de esta manera disminuir el riesgo de calcular probabilidades de mortalidad falsamente elevadas que pudieran evitar el acceso a una unidad de cuidados intensivos a un paciente que podría tener beneficio de la misma.

Referencias bibliográficas

1. Ecker, S., & Beck, S. (2019). The epigenetic clock: a molecular crystal ball for human aging?. *Aging*, 11(2), 833–835.
2. Jiang, S., & Guo, Y. (2020). Epigenetic Clock: DNA Methylation in Aging. *Stem cells international*, 2020, 1047896.
3. Bouch, David & Thompson, Jonathan. (2008). Severity scoring systems in the critically ILL. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. 8. 181-185.
4. Knaus, W. A., Zimmerman, J. E., Wagner, D. P., Draper, E. A., & Lawrence, D. E. (1981). APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Critical care medicine*, 9(8), 591–597.
5. Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P., & Zimmerman, J. E. (1985). APACHE II: a severity of disease classification system. *Critical care medicine*, 13(10), 818–829.
6. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, Zimmerman JE, Bergner M, Bastos PG, Sirio CA, Murphy DJ, Lotring T, Damiano A, et al. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest*. 1991 Dec;100(6):1619-36.
7. Zimmerman, J. E., Kramer, A. A., McNair, D. S., & Malila, F. M. (2006). Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) IV: hospital mortality assessment for today's critically ill patients. *Critical care medicine*, 34(5), 1297–1310.
8. Le Gall, J. R., Loirat, P., Alperovitch, A., Glaser, P., Granthil, C., Mathieu, D., Mercier, P., Thomas, R., & Villers, D. (1984). A simplified acute physiology score for ICU patients. *Critical care medicine*, 12(11), 975–977.
9. Le Gall, J. R., Lemeshow, S., & Saulnier, F. (1993). A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*, 270(24), 2957–2963.

10. Soto-Mota, A., Marfil-Garza, B. A., Martínez Rodríguez, E., Barreto Rodríguez, J. O., López Romo, A. E., Alberti Minutti, P., Alexandre Loya, J. V., Pérez Talavera, F. E., Ávila Cervera, F. J., Velazquez Burciaga, A., Morado Aramburo, O., Piña Olguín, L. A., Soto-Rodríguez, A., Castañeda Prado, A., Santillán Doherty, P., O Galindo, J., Guízar García, L. A., Hernández Gordillo, D., & Gutiérrez Mejía, J. (2020). The low-harm score for predicting mortality in patients diagnosed with COVID-19: A multicentric validation study. *Journal of the American College of Emergency Physicians open*, 1(6), 1436–1443.
11. Bello-Chavolla, O. Y., Antonio-Villa, N. E., Ortiz-Brizuela, E., Vargas-Vázquez, A., González-Lara, M. F., de Leon, A. P., Sifuentes-Osornio, J., & Aguilar-Salinas, C. A. (2020). Validation and repurposing of the MSL-COVID-19 score for prediction of severe COVID-19 using simple clinical predictors in a triage setting: The Nutri-CoV score. *PloS one*, 15(12), e0244051.
12. Jung, M., & Pfeifer, G. P. (2015). Aging and DNA methylation. *BMC biology*, 13, 7.
13. Berdishev MT, Korotaev GK, Boiarskikh GV, Vanyushin BF. Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback salmon and its changes during spawning. *Biokhimiia*. 1967;38:988–93. 8.
14. Romanov, G. A., & Vanyushin, B. F. (1981). Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction. *Biochimica et biophysica acta*, 653(2), 204–218.
15. Heyn, H., Li, N., Ferreira, H. J., Moran, S., Pisano, D. G., Gomez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J. V., Setien, F., Carmona, F. J., Puca, A. A., Sayols, S., Pujana, M. A., Serra-Musach, J., Iglesias-Platas, I., Formiga, F., Fernandez, A. F., Fraga, M. F., Heath, S. C., ... Esteller, M. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), 10522–10527.
16. Florath, I., Butterbach, K., Müller, H., Bewerunge-Hudler, M., & Brenner, H. (2014). Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with

- age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Human molecular genetics*, 23(5), 1186–1201.
17. Horvath S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology*, 14(10), R115.
 18. Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J. B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., & Zhang, K. (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular cell*, 49(2), 359–367.
 19. Weidner, C.I., Lin, Q., Koch, C.M. et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol* 15, R24 (2014).
 20. Levine, M. E., Lu, A. T., Quach, A., Chen, B. H., Assimes, T. L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A. A., Stewart, J. D., Li, Y., Whitsel, E. A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L., & Horvath, S. (2018). An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*, 10(4), 573–591.
 21. McCrory, C., Fiorito, G., Hernandez, B., Polidoro, S., O'Halloran, A. M., Hever, A., Ni Cheallaigh, C., Lu, A. T., Horvath, S., Vineis, P., & Kenny, R. A. (2021). GrimAge Outperforms Other Epigenetic Clocks in the Prediction of Age-Related Clinical Phenotypes and All-Cause Mortality. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 76(5), 741–749.
 22. Lee, T. H., Marcantonio, E. R., Mangione, C. M., Thomas, E. J., Polanczyk, C. A., Cook, E. F., Sugarbaker, D. J., Donaldson, M. C., Poss, R., Ho, K. K., Ludwig, L. E., Pedan, A., & Goldman, L. (1999). Derivation and prospective validation of a simple index for prediction of cardiac risk of major noncardiac surgery. *Circulation*, 100(10), 1043–1049.
 23. Horby, P., Lim, W. S., Emberson, J. R., Mafham, M., Bell, J. L., Linsell, L., Staplin, N., Brightling, C., Ustianowski, A., Elmahi, E., Prudon, B., Green, C., Felton, T., Chadwick, D., Rege, K., Fegan, C., Chappell, L. C., Faust, S. N.,

Jaki, T., ... Landray, M. J. (2021). Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *The New England journal of medicine*, 384(8), 693–704.