



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN PSICOLOGÍA  
NEUROCIENCIAS DE LA CONDUCTA

**ANÁLISIS INTEGRATIVO DEL METILOMA GENÓMICO Y TRANSCRIPTOMA  
DE LA CORTEZA PREFRONTAL ASOCIADO A SUICIDIO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN PSICOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**ANA LUISA ROMERO PIMENTEL**

**TUTOR PRINCIPAL:** DR. JOSÉ HUMBERTO NICOLINI SÁNCHEZ  
Programa de Maestría y Doctorado en Psicología,  
Neurociencias de la Conducta  
Facultad de Psicología UNAM

**COMITÉ TUTOR:** DR. JULIO CESAR FLORES LAZARO  
Programa de Maestría y Doctorado en Psicología,  
Neurociencias de la Conducta  
Facultad de Psicología UNAM

DR. GONZALO FLORES ÁLVAREZ  
Lab. de Neuropsiquiatría, Instituto de Fisiología,  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

DRA. ANA FRESÁN ORELLANA  
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la  
Fuente Muñiz

DRA. GABRIELA ARIADNA MARTÍNEZ LEVY  
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la  
Fuente Muñiz

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para efectuar mis estudios de Doctorado. Becario No. de registro CONACYT: 486265/277603.

Al posgrado en Psicología la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) por brindarme la infraestructura y el apoyo necesario para desarrollar mis estudios de posgrado.

Al gobierno del estado de Tlaxcala y a la coordinación de estudios de Posgrado por becas complementarias para llevar a cabo una estancia de investigación en el grupo de estudios de Suicidio de la Universidad de McGill en Montreal, Canadá.

Al Dr. Humberto Nicolini por la confianza y apoyo para realizar la presente investigación, por el apoyo incondicional para recibir y retroalimentar las ideas relacionadas al desarrollo del proyecto, así como su impulso y motivación para tomar cursos y presentar el trabajo en congresos internacionales lo cual impacto de manera positiva mi carrera profesional.

A la Dra. Mirna Morales gracias por el apoyo incondicional, las enseñanzas en técnicas para evaluar ácidos nucleicos, los comentarios pertinentes para fortalecer mi formación como investigadora y los comentarios que guiaron la congruencia del proyecto. A la Dra. Claudia Rangel, por las enseñanzas para el manejo e interpretación masivo de datos, lo cual fue fundamental para darle sentido a la investigación. A la Dra. Gabriela Martínez por todas las enseñanzas en conceptos de metilación y sugerencias pertinentes, las cuales fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación. A la Dra. Ana Fresan por las oportunidades y conocimientos transferidos sobre metodología de la investigación y suicidio. Gracias a las cuatro por su profesionalismo y ser modelos inspiradores de mujeres en la ciencia.

Al Dr. Gonzalo Flores, Dr. Rubén Vázquez y Dr. Fernando García por la confianza y apoyo desde maestría, por colaborar y apoyar para acceder a las muestras cerebrales.

Al Dr. Roberto Mendoza y Dr. Elier González, gracias por sus conocimientos en patología y psiquiatría forense, por brindarme su apoyo incondicional para la toma de muestra y diagnósticos psiquiátricos, junto a ustedes aprendí cara a cara el fenómeno del suicidio, apoyaron al estudio de mas de 500 casos de suicidio de manera desinteresada, gracias infinitas, valoro y aprecio mucho su genuina amistad.

Al Dr. Guilherme Borges por todas sus enseñanzas relacionadas a la epidemiologia del suicidio, por la apertura y confianza de escribir un articulo y mostrarme todo el proceso que conlleva.

Al Dr. Julio Flores por ser parte de mi comité tutorial, por la lectura del trabajo y comentarios de mejora.

## **Agradecimientos a título personal:**

A mis compañeros de laboratorio, Carla Márquez, Alejandro Rojo, Frida Lira, Jonatán Torres, por sus observaciones y discusiones que aportaron al desarrollo del presente trabajo. Por su energía positiva, trabajo colaborativo y optimismo.

A Lizbeth Escobedo estudiante de Licenciatura que me ayudo con la lectura y colección de datos de más de 500 expedientes forenses.

A mis compañeros de Posgrado, Omar del Valle, Jhoanna Sánchez, Sandra Salcido, Jeremy Cruz, Nicolás Martínez por las observaciones y guía que aportaron para estructurar el proyecto.

A mis compañeros de Instituto, Said Muñoz, Paulina Baca, Alberto Tanda, Aldo de la Cruz, Paulette Castro, Magdalena Ríos, por sus retroalimentaciones valiosas en seminarios y congresos.

A todos los miembros del grupo de Estudio de Suicidio de McGill, y al Dr. Gustav Turecki por aceptarme como parte de su equipo, por la confianza, la retroalimentación, en especial a Daniel Almeida, Corina Nagy, Gary Chen y JF Throux, los cuales me enseñaron herramientas de diseño de primers, conversión por bisulfito, técnicas de secuenciación y análisis de datos, esto impulso el proyecto doctoral de una manera inigualable. También gracias a Sarah Burns por compartirme conocimientos los cuales fueron de extrema importancia para mi carrera profesional.

***Dedico esta tesis a mi Familia***

***A mis padres***

***Rubén Romero y Ana Luisa Pimentel***

***A mis hermanos***

***y sobretodo a mis sobrinas***

***Aida García y Ana Celia García***  
***(mis fuentes de inspiración y amor)***

***Sin su respaldo este proyecto no lo hubiera alcanzado***

***Gracias***

# Índice

Índice de Tablas.....	8
Índice de Figuras.....	9
Lista de Abreviaturas .....	10
Resumen.....	11
Abstract.....	13
1. Introducción.....	15
2 Marco Teórico.....	17
2.1 El problema del Suicidio.....	17
2.2 El rol de la corteza prefrontal en la etiología del suicidio .....	19
2.3 Influencia genético – ambiental.....	20
2.4 Regulación epigenética .....	22
2.5 Estudios de la metilación del ADN en muestras post-mortem asociadas a suicidio.....	23
3. Justificación .....	29
4. Objetivo general.....	30
4.1 Objetivos específicos .....	30
4.2. Pregunta de investigación.....	30
4.3 Hipótesis.....	31
5. Materiales y Métodos .....	31
5.1 Consideraciones éticas .....	31
5.2 Estrategia experimental.....	31
5.3 Evaluación y selección de sujetos .....	34
5.4 Fuente de información y cuestionario de recolección de datos .....	35
5.5 Obtención de muestras y almacenamiento.....	35
5.6 Procedimientos Experimentales .....	36
5.6.2 Cuantificación e integridad de ácidos nucleicos.....	37
5.6.3 Obtención del transcriptoma .....	38
5.6.4 Obtención del metiloma .....	38
5.7 Análisis estadísticos y Pre-procesamiento de los datos genómicos.....	40
5.7.1 Pre-procesamiento del Microarreglo de expresión HT-12 BeadChip.....	40
5.7.2 Pre-procesamiento del Microarreglo Human Methylation 450k.....	41
5.7.3 Análisis diferencial del transcriptoma .....	41
5.7.4 Análisis diferencial del metiloma .....	42
5.7.5. Análisis de efecto de confusión por composición celular de las muestras.....	43

5.7.6. Análisis de concordancia entre genes diferencialmente expresados y regiones genómicas diferencialmente metiladas. ....	43
5.7.7. Análisis de enriquecimiento genómico.....	44
5.7.8 Análisis de secuenciación dirigida por bisulfito para validación técnica .....	44
6. Resultados.....	46
6.1 Características descriptivas de la muestra .....	46
6.2 Evaluación de la calidad y cantidad de ácidos nucleicos.....	49
6.3 Controles de Calidad de los microarreglos .....	50
6.4 Normalización de datos .....	53
6.5 Expresión genética diferencial.....	55
6.6 Alteraciones en el metiloma.....	59
6.6.1 Resultados de sitios puntuales de metilación diferencial (DMPs).....	59
6.6.2 Regiones de metilación diferencial (DMRs).....	60
6.7. Alteraciones concordantes entre genes diferencialmente expresados y regiones genómicas diferencialmente metiladas .....	62
6.8 Análisis de vías biológicas y enriquecimiento funcional de genes.....	65
6.9 Validación de región diferencialmente metilada por secuenciación dirigida por de bisulfito .....	67
7. Discusión .....	70
8. Limitaciones y direcciones para investigaciones futuras.....	79
9. Conclusiones .....	81
Referencias .....	82



## Índice de Tablas

Tabla I. Estudios post-mortem del metiloma cerebral asociados a suicidio.

Tabla II. Características clínicas y demográficas de la muestra de estudio.

Tabla III. Cuantificación y niveles de pureza de los ácidos nucleicos extraídos.

Tabla IV. Lista de genes diferencialmente expresados en el área de BA9 en la comparación casos y controles.

Tabla V. Top 10 de regiones diferencialmente metiladas (DMRs) y entre casos y controles.

Tabla VI. Top de regiones diferencialmente metiladas y su concordancia en cambios de expresión entre casos y controles.

Tabla VII. Análisis de enriquecimiento de genes diferencialmente metilados y expresados asociados a suicidio. Top 5 de las rutas más importantes ordenadas por valores de p.

Tabla VIII: Lista de genes sobre representados en vías de asociación biológicas ordenados por relevancia biológica.

## Índice de Figuras

Figura 1. Estrategia experimental.

Figura 2. Definición de valor de beta ( $\beta$ ).

Figura 3. Visualización de la integridad del ADN extraído a través de gel de agarosa al 1%.

Figura 4. Gráfica de barras que representa la media de los valores de  $p$  de detección de sondas de las muestras del microarreglo de metilación.

Figura 5. Gráficas de puntos que visualizan la media de intensidad de las sondas que representan la calidad de la conversión por bisulfito (A) e hibridación (B) del chip.

Figura 6. Gráfica de densidades de los valores de beta para cada una de las muestras antes y después de ser normalizados.

Figura 7. Expresión diferencial entre casos y controles.

Figura 8. Expresión diferencial de genes de la corteza prefrontal en casos y controles.

Figura 9. Sitios puntuales de metilación diferencial entre casos y controles.

Figura 10. Niveles estimados de metilación diferencial en sitios puntuales CpG.

Figura 11. Niveles estimados de metilación diferencial en regiones del genoma.

Figura 12. Diagrama proporcional de Venn que muestra la superposición de diferencias entre las DMP diferenciales y la expresión génica (A), los DMR y la expresión génica (B) entre los casos y los controles.

Figura 13. Correlación de los valores de metilación en la región 10219 del gen *ADCY9* evaluada a través del microarreglo Illumina BeadChip de 480k y secuenciación dirigida de bisulfito.

## Lista de Abreviaturas

450 K	Microarreglo de metilación 450 Human BeadChip
ADN	Ácido reboxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BA	Broadmann
CpG	Citosina y Guanina
Cro	Cromosoma
COFM	Corteza orbitofrontal medial
CPDL	Corteza prefrontal dorsolateral
DMPs	Sitios diferencialmente metilados
DMRs	Regiones diferencialmente metiladas
DNMT	DNA metiltransferasa
FDR	<i>False discovery ratio</i>
GL	Grados libertad
HPA	Hipotálamo hipofisario adrenal
HT-12v	Microarreglo de expresión Human HT-12v
IGR	Región intragénica
INCIFO	Instituto de Ciencias Forenses
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
LFC	Long Fold Change
RIN	Valor de integridad del ARN
SNC	Sistema Nervioso Central

## Resumen

El suicidio es un problema de salud pública con la mayoría de muertes registradas en países de bajo y medio ingreso. La etiología del suicidio es compleja y está influenciada por múltiples factores de riesgo. Mientras que se han descrito numerosos marcadores clínicos y sociodemográficos asociados al suicidio, las bases moleculares subyacentes siguen siendo poco conocidas. Recientemente, los mecanismos epigenéticos se han asociado al suicidio. En este estudio identificamos las alteraciones en el mecanismo epigenético de metilación y su efecto en la transcripción de genes de la corteza prefrontal dorsolateral de individuos finados por suicidio.

En colaboración con el Instituto de Ciencias Forenses del Tribunal Superior de Justicia de la Ciudad de México se formó un banco de muestras cerebrales. Se eligieron 48 para formar la cohorte de estudio; 13 controles y 35 casos provenientes de hombres entre 18 y 60 años. Se extrajeron ácidos nucleicos (ADN y ARN) de la corteza pre-frontal dorsolateral y se analizaron con los microarreglos Illumina Infinium y BeadChip HumanHT-12.

Reportamos evidencia para 4,430 zonas diferencialmente metiladas ( $p < 0.05$ , Mean Beta Fold Change  $> \pm 0.01$ ) y 621 transcritos con cambios en expresión ( $p < 0.02$ , Log Fold Change  $\geq 0.3$  y FDR=0.01) en un análisis de casos y controles, de los cuales 70 presentan una relación metilación-expresión. El análisis de vías biológicas identificó a diez genes biológicamente relevantes para procesos relacionados con fenotipos psiquiátricos y suicidio (*ADCY9*, *CRH*, *NFATC4*, *ABCC8*, *HMGA1*, *KAT2A*, *EPHA2*, *TRRAP*, *CD22*, *CBLN1*) y destacó la asociación de

*ADCY9* con varias vías biológicas, incluida la inflamación regulada el factor inhibidor de la migración de macrófagos y el proceso neurofisiológico regulado por la hormona liberadora de corticotropina. Validamos técnicamente la metilación alterada de la región en *ADCY9* a través de la secuenciación dirigida de bisulfito.

Nuestro estudio representa el primer análisis en tejido cerebral post-mortem de la metilación del ADN y su efecto en el transcriptoma en individuos con causa de muerte por suicidio en una población mexicana, y proporciona nuevos conocimientos sobre las alteraciones moleculares asociadas con el suicidio.

**Palabras clave:** *Metiloma, Transcriptoma, Suicidio, cerebro post-mortem, México.*

## Abstract

Suicide represents a major health concern with the majority of the deaths registered in developing countries. While many demographic risk factors have been proposed, the underlying molecular pathology of suicide remains poorly understood. A body of evidence suggests that aberrant DNA methylation is involved. In this study, we examined DNA methylation profiles and concordant gene expression changes in pre-frontal cortex of Mexicans who die by suicide.

In collaboration with the Coroner's office in Mexico City, brain samples of males who died by suicide (n=35) and age-matched sudden death controls (n=13) were collected. Nucleic acids (DNA and ARN) were extracted from the pre-frontal cortex and analyzed with Infinium Methylation480k Beadchip and the HumanHT-12 v4 Expression Beadchip.

We report evidence for altered DNA methylation profiles at several genomic regions together with 622 genes with differential expression changes in cases versus controls. Seventy genes were found to have concordant methylation and expression change. Metacore enriched analysis identify ten genes to be biological relevant to process related to psychiatric phenotypes and suicide (*ADCY9*, *CRH*, *NFATC4*, *ABCC8*, *HMGA1*, *KAT2A*, *EPHA2*, *TRRAP*, *CD22*, *CBLN1*) and highlighted *ADCY9* association with various pathways including inflammation regulated by the macrophage migration inhibitory factor, signal transduction regulated by the cAMP-

responsive element modulator, neurophysiological process regulated by the corticotrophin-releasing hormone. We confirmed ADCY9 altered methylation through targeted bisulfate sequencing.

Our study represents the first analysis of DNA methylation and gene expression associated with suicide in a Mexican population using post-mortem brain, providing novel insights for convergent molecular alterations associated with suicide.

**Keywords:** *Methylomic, Transcriptomic, Suicide, Post-mortem Brain, Mexico*

## 1. Introducción

El suicidio representa un importante problema de salud pública mundial, provoca la mitad de las muertes violentas en hombres y es la segunda causa de defunción en adolescentes. La mayoría de las muertes se registran en países en vías de desarrollo y la tasa de mortalidad en México ha aumentado en los últimos años. La etiología del suicidio es multifactorial y se le han implicado diversos factores de riesgo. Los factores de riesgo socioculturales, como las crisis financieras, desempleo, difícil acceso a los sistemas de salud, educación y la violencia están relacionados con el suicidio. México ha sido colocado como uno de los países con mayores niveles de desigualdad social en el mundo, en consecuencia, un gran porcentaje de habitantes está expuesto a dicho contexto sociocultural. La adversidad aguda o crónica en un individuo puede afectar los mecanismos de afrontamiento al estrés e impactar el funcionamiento del sistema nervioso central, provocando alteraciones morfológicas y fisiológicas en la corteza prefrontal. Esta región neuroanatómica participa en la regulación de funciones mentales superiores, tales como; toma de decisiones y control del dolor emocional, las cuales se encuentran comprometidas en la conducta suicida. Algunas investigaciones han detectado alteraciones en la expresión de genes que constituyen a los sistemas GABAérgico, neurotrófico, el eje hipotalámico hipofisario adrenal y el sistema inmunitario en dicha zona cerebral. Estos genes han estado relacionados con el suicidio al ser moléculas involucradas en la regulación de respuestas al estrés y comunicación celular.



Los mecanismos de regulación epigenética han sido recientemente implicados en la etiología del suicidio porque ayudan a explicar la interacción compleja entre los factores ambientales y los factores genéticos en la aparición de la conducta suicida. Un método en neurociencias que se puede utilizar para medir esta relación es a través de las herramientas de alto rendimiento para la detección del genoma completo. Pocas investigaciones se han centrado en el estudio de los patrones de metilación a nivel genómico en muestras cerebrales de individuos con causa de muerte por suicidio, y ninguno se ha enfocado en estudiar poblaciones con características como la mexicana, aunque diversas investigaciones se han enfocado en el estudio de genes candidatos en muestras sanguíneas y principalmente en poblaciones de tipo caucásicas.

Dada la importancia de conocer las características epigenéticas como variables de riesgo y mediadoras en el suicidio, el presente estudio analizará los patrones de metilación de genes que constituyen la corteza prefrontal de mexicanos con causa de muerte por suicidio. Además, para investigar el posible papel funcional, analizamos su efecto a nivel transcriptómico.

## 2 Marco Teórico

### 2.1 El problema del Suicidio

El suicidio es reconocido como un crítico problema de salud, a nivel mundial es la segunda causa de muerte en jóvenes y se estima que, por cada suicidio, hay al menos veinte tentativas (OMS, 2014). La carga social y económica para estos individuos y sus familiares es elevada. Estudios epidemiológicos han determinado que cada 3 segundos alguien intenta quitarse la vida y cada 40 alguien lo consigue (OMS, 2014), confirmando que los suicidios son relativamente comunes; además, el 80% de los afectados son hombres que al momento de la muerte padecían alguna condición psiquiátrica; por ejemplo: depresión, ansiedad, abuso de sustancias, estrés post-traumático y trastornos de tipo adaptativo (OMS, 2014).

Aunque la prevalencia de los suicidios en países de bajo y mediano ingreso es menor que en los países de alto ingreso (11.2 vs. 12.7 por cada 100 mil habitantes), el 75% de las muertes por suicidio ocurren en países de bajo y mediano ingreso. De hecho, en México, la tasa de mortalidad por esta causa en el 2000 fue de 5.95 por cada 100,000 habitantes y para el 2016 aumentó a 8.50 por cada 100,000 habitantes (INEGI, 2017). Este incremento puede ser el resultado de los cambios de criterio para el registro de las muertes por suicidio, sin embargo, no se puede descartar un aumento en los factores de riesgo sociales.

La Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-10 define al suicidio como la acción de quitarse la vida de forma voluntaria y premeditada. Se refiere a la muerte por lesión auto-infligida, con evidencia implícita o explícita, deliberadamente iniciada por la persona, intencional, en la que se obtiene el

resultado deseado de morir. Está clasificado al mismo nivel que las causas externas de mortalidad en los códigos X-60 a X-84 y se clasifican según el método empleado. El Manual Diagnóstico y Estadístico de las Enfermedades Mentales (DSM-5) considera al suicidio como una complicación de trastornos psiquiátricos, fundamentalmente de trastornos del estado de ánimo. Sin embargo, la conducta suicida puede ser impulsiva o presentarse en otro tipo de patologías (Oquendo, 2015).

Los factores de riesgo subyacentes al suicidio incluyen complejas interacciones entre predisposiciones biológicas, características psicológicas, sociales, culturales y ambientales. Los predictores con mayor riesgo para morir por esta causa son antecedentes familiares de suicidio, intento previo y la presencia de una condición psiquiátrica (Kim et al., 2005). Entre los factores de riesgo sociales se destacan las crisis económicas, el desempleo, la falta de acceso a sistemas de salud y educación, malas condiciones de vivienda, altos niveles de violencia, desnutrición, entre otros (OMS, 2014).

En México, un gran porcentaje de habitantes se encuentran dentro del contexto social antes descrito, ya que se ha ubicado entre los países con los niveles más altos de desigualdad social en el mundo (Piacentini, 2014). Además, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2012, se reportó un aumento en la percepción de violencia interpersonal, lo que incluye a la violencia comunitaria, como lo son los robos, peleas y secuestros (ENSANUT, 2012). También se informó de un aumento de violencia doméstica, inseguridad alimentaria, bajos puntajes en los indicadores de bienestar infantil y baja cobertura de salud efectiva (Mundo-Rosas et al., 2018; ENSANUT, 2012). La asociación

entre pobreza y la alza en las tasas de suicidio ha sido previamente descrito alrededor del mundo (Lemmi et al., 2016; Oyesanya, Lopez-Morinigo, y Dutta 2015; Vijayakumar et al., 2005). Sin embargo, aun cuando se tiene conocimiento de que estos factores influyen en el desarrollo de la conducta suicida, la causa sigue siendo desconocida, por lo que es importante seguir identificando factores que se relacionen con su etiología.

## **2.2 El rol de la corteza prefrontal en la etiología del suicidio**

El desarrollo de la conducta suicida implica múltiples factores de riesgo sociales, junto con cambios neuroadaptativos de núcleos cerebrales. La corteza prefrontal dorsolateral (CPDL) es una región del cerebro que ha sido ampliamente estudiada en el suicidio, porque participa en la regulación de las funciones mentales superiores, el control de impulsos, el dolor emocional y la toma de decisiones (Revisión de Desmyter et al., 2011; Jollan et al., 2010; Jollant et al., 2005). La CPDL consiste en las porciones laterales del área de Brodmann (BA) 9, 10, 44, 45, 46 (Damasio, 1996). Es considerada como una corteza de asociación, heteromodal, que recibe conexiones de las áreas paralímbicas y de las áreas unimodales (Mesulam, 2000). Los mayores cambios anatómicos y funcionales han sido reportados en el BA9 y BA11, ya que forman parte de la red neuronal fronto-estriatal, circuito implicado en la regulación de emociones, el estrés y la cognición (Petrides, 2005). Wagner et al., (2012), estudiaron la asociación del volumen cortical y la conducta suicida, encontrando como resultado principal que los individuos con mayor riesgo a morir por suicidio poseían una disminución en el grosor cortical de la materia gris, lo que implica una probable atrofia celular y

menor densidad neuronal. En otro estudio, se encontró una consistente anomalía en el flujo sanguíneo de sujetos con causa de muerte por suicidio. El cambio reportado en el estudio aparentemente influía en un déficit en el control de impulsos y una desregulación en el sistema límbico (Amen et al., 2009). Jollan et al., (2011) mostraron mayor actividad en la CPDL de personas con intento suicida ante estímulos de caras enojadas, lo que implica una mayor sensibilidad a estímulos adversos. Además, se ha observado una disminución en el número de sinapsis, pérdida de espinas dendríticas y alteraciones en el número de dendritas en la CPDL (Kang et al., 2012). Estos cambios en la maquinaria sináptica están asociados con la desregulación de distintos transcritos de ARN (Zhou et al., 2018). De hecho, se han encontrado cambios transcripcionales a lo largo del genoma de la CPDL en numerosos estudios en tejido post-mortem humano asociado al suicidio (Fiori y Turecki, 2010; Tochigi et al., 2008; Kang et al., 2007), lo que también sugiere implicación de factores genéticos en los cambios neuroadaptativos asociados a suicidio.

### **2.3 Influencia genético – ambiental**

Estudios de epidemiología genética han probado que la estructura genética de este fenómeno es complejo y heterogéneo, donde los factores genéticos explican parcialmente la etiología del suicidio. Algunos estudios han demostrado que la heredabilidad del suicidio varía entre el 30 y 55% (Revisión de Sokolowski et al., 2015), valores menores a los observados en trastornos psiquiátricos como 67% en esquizofrenia y 62% en trastorno bipolar (Wray y Gottesman 2012). Además, estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado

hasta 212 variantes genéticas asociadas con el suicidio (Mullins et al., 2019; Galfalvy et al., 2013; Willour et al., 2012; Schosser et al., 2011). Sin embargo, estos estudios han sido hasta cierto punto desalentadores, ya que ninguna variante ha tenido un efecto lo suficientemente grande para considerarla un factor causal, sugiriendo que la conducta suicida podría estar influenciada por múltiples *loci* genéticos, cada uno con efectos pequeños, y que las variantes genéticas individuales probablemente explican una porción pequeña de la proporción fenotípica total del suicidio. Asimismo, existe una alta discordancia en la conducta suicida entre gemelos idénticos (76.5%) y no idénticos (99%) (Revisión de Sokolowski et al., 2015). Esta evidencia sugiere que otros factores como los ambientales podrían tener mayor efecto regulador de la conducta suicida, por ejemplo, la adversidad en la infancia, traumas infantiles, la trayectoria de vida, los mecanismos de afrontamiento al estrés y bajo estatus socioeconómicos (Turecki, 2014). Como resultado, actualmente se considera que las interacciones en conjunto genómico-ambientales son los que confieren un riesgo para desarrollar conducta suicida y que estas pueden estar mediadas por los mecanismos epigenéticos (Cheung et al., 2020; Anacker, O'Donnell, y Meaney 2014).

En el campo de la psiquiatría la hipótesis sustenta que los factores ambientales cambian la programación epigenética de células en el cerebro y dan como resultado síntomas y conductas asociadas a los trastornos psiquiátricos (Sun, Kennedy, y Nestler 2013). Por ejemplo, en el estudio de modelos animales de depresión, se mostró que el sometimiento a paradigmas de miedo provoca cambios en los patrones de metilación y expresión de genes (Dalton, Kolshus, y

McLoughlin 2014). Posteriormente, los estudios en humanos con diagnóstico de depresión, han sustentado que las modificaciones epigenéticas asociadas a cambios en la expresión de genes son provocadas por factores ambientales (Nagy, Vaillancourt, y Turecki 2018). En el contexto del suicidio, se ha sugerido que la adversidad temprana en la vida, el estrés crónico, la contaminación, entre otros factores de riesgo, provocan cambios sostenidos en el epigenoma de los individuos (Turecki, et al., 2014).

## **2.4 Regulación epigenética**

Aunque los mecanismos epigenéticos han sido ampliamente estudiados en la biología del desarrollo, la oncología y la botánica, no obstante, este es un campo relativamente nuevo dentro de la psiquiatría. El término “epigenética” se refiere a los mecanismos que regulan la expresión de genes y que no se relacionan con cambios en la secuencia del ADN, por lo tanto, son cambios “por encima del genoma” (Felsenfeld, 2014). La metilación del ADN es la modificación epigenética más estudiada en mamíferos, que ocurre principalmente, aunque no exclusivamente, en los dinucleótidos de citosina-guanina (CpG). La metilación en los promotores de genes está relacionada con la represión transcripcional, a menudo a través del reclutamiento de proteínas de unión a metilo y enzimas remodeladoras de cromatina (Roy, Shelton, y Dwivedi 2017). También se ha demostrado que la presencia de metilación de citosinas dentro de los sitios promotores reprime directamente la transcripción mediante la prevención de la unión de factores de transcripción. Por el contrario, la metilación de citosina dentro de los cuerpos de genes puede promover la expresión de genes a través de la

regulación negativa de represores transcripcionales y el empalme alternativo (Jones, 2012). También, la cantidad de CpGs son de gran interés en el efecto de la metilación debido a su condición como secuencia diana. Las regiones en las que la riqueza de CpGs abarca entre el 60 – 70% se denominan islas CpG. Estas tienen un tamaño variable de 300 a 1500 pares de bases (pb) y generalmente se encuentran en promotores o en los primeros exones de los genes (Deaton y Bird 2011). En el 70% de los casos, las islas CpG están asociadas a sitios de inicio de transcripción (TSS). Mientras que los sitios CpG ubicados de manera aislada en el genoma son considerados como sitios de mar abierto y su hipometilación está relacionada con la inestabilidad cromosómica, la activación de genes y la pérdida de impronta (Timp et al., 2014).

## **2.5 Estudios de la metilación del ADN en muestras post-mortem asociadas a suicidio**

Algunos estudios se han enfocado en la identificación de genes con alteración en metilación y que sean relevantes en la fisiopatología del suicidio, como es el caso de *GABRA1*, gen blanco del sistema GABAérgico, el cual se observó hipermetilado en los sitios CpGs lo que llevó a una sobre expresión de su transcrito (Poulter, 2008). También se encontraron alteraciones en genes que participan en el sistema de las neurotrofinas, poliaminas y plasticidad sináptica (*TRKB*, *BDNF*, *ARG2*, *SYN*) (Cruceanu et al., 2016; Maussion et al., 2014; Keller et al., 2010; Gross et al., 2013; Ernst et al., 2009), estudios descritos en poblaciones caucásicas.

Sin embargo, la mayoría de ellos se han realizado mediante técnicas de gen candidato o estudio de secuencias específicas, la cual tienen la limitación de



no evaluar la metilación distribuida a lo largo del genoma y perder información sobre otras regiones génicas implicadas, por lo que algunos estudios han comenzado a utilizar herramientas de alto rendimiento para realizar perfiles de metilación asociadas a suicidio.

Las herramientas de alto rendimiento para la detección del genoma completo fueron introducidas en los laboratorios genómicos hace ya más de una década. Su impacto en la revolución tecnológica ha tenido implicaciones importantes en el área de la biología y la medicina. Estas herramientas permiten detectar cambios genómicos de forma paralela y masiva en diferentes regiones específicas en un único experimento, incluyendo las modificaciones epigenéticas asociadas a cambios en la metilación del ADN y la expresión de genes. Gracias a este progreso, se ha dado un incremento considerable en el descubrimiento de moléculas asociadas a diferentes enfermedades y a esclarecer sus bases moleculares (Vermeesch, Voet, y Devriendt 2016).

Dentro de las herramientas de alto rendimiento para la detección del genoma completo, los microarreglos han sido una opción para el análisis de perfiles de metilación en el suicidio. Por ejemplo, uno de los primeros estudios analizó cambios en el metiloma del hipocampo en muestras post-mortem de casos de suicidio y un grupo control. Se reportaron alteraciones en 366 regiones promotoras con efectos en la expresión de genes, la mayoría de ellos se encontraban hipermetilados y en transcritos implicados a procesos cognitivos (Labonté et al., 2013).

Otro estudio analizó la corteza prefrontal de casos de suicidio de hombres y mujeres con diagnóstico de depresión, reportaron mayores niveles de metilación

global para el grupo de casos en comparación a controles. También detectaron cambios en genes que participan en el ciclo celular y muerte celular programada, sin embargo, este estudio no contempló si los cambios en la metilación tenían un efecto en la transcripción (Haghighi et al., 2014). Asimismo, otro estudio analizó cambios puntuales en sitios CpG del genoma en 6 casos y 6 controles, donde no se encontraron cambios significativos en ningún gen después de aplicar ajustes en pruebas estadísticas para pruebas que implican múltiples comparaciones.

Probablemente, los resultados se vieron afectados al tener un número bajo de muestra, aun así, los análisis de ontología destacaron la tendencia del enriquecimiento de genes involucrados en la transcripción (Schneider et al., 2015). Otro estudio comparó los patrones de metilación de dos regiones cerebrales entre 20 casos de suicidio asociados a depresión y 20 controles. Observaron diferencias en los niveles de metilación en al menos tres regiones del genoma.

Interesantemente, se destacó la hipometilación de todos los sitios CpG del gen *PSORS1C3* en ambas regiones cerebrales para los casos, sugiriendo una probable alteración en su transcrito independiente a la región cerebral. Esto es novedoso, ya que este gen ha sido previamente asociado con la susceptibilidad de contraer psoriasis, una enfermedad autoinmunitaria y, en los últimos años, se está fortaleciendo la evidencia de que el sistema inmunitario podría jugar un rol importante en la etiología de las enfermedades psiquiátricas severas y, en este caso, en el suicidio (Murphy et al., 2017).

Por otro lado, en el estudio con mayor número de muestras post-mortem, fue un meta-análisis que contempla 211 cortezas pre-frontales y 114 cerebelos, se encontraron tres regiones diferencialmente metiladas en suicidio para la corteza

prefrontal y ocho en cerebelo. La región ubicada en el promotor del gen *PSORS1C3* fue el resultado más sobresaliente, se identificó como hipermetilada y posteriormente su transcrito fue evaluado, donde se identificó expresión a la baja, lo que implicaría que el estado de metilación de esa región genómica tiene la potencia de modificar la actividad promotora y tener un impacto en la transcripción (Policicchio et al., 2020). Este estudio no evaluó el transcriptoma, por lo que se desconoce, si las otras regiones génicas presentan un efecto en los transcritos. Cabe mencionar que la mayoría de los estudios que evalúan cambios en el metiloma no evalúan el efecto en el transcriptoma de manera simultánea, además ningún estudio, se ha enfocado a evidenciar estos cambios en población Latina, como se indica en la Tabla I. **Es así que el presente estudio pretende analizar en población Mexicana la corteza prefrontal, alteraciones en la metilación de genes y su efecto en cambios de expresión de transcritos para identificar vías biológicas asociadas al suicidio en las que este mecanismo epigenético se encuentra implicado.**

Tabla I. Estudios post-mortem del metiloma cerebral asociados a suicidio.

Zona cerebral	Muestra (n)	Etnicidad	Técnica	Genes	Vías biológicas	Autor
Giro dentado	46 casos 16 controles	Europea	Arreglo Agilent 400 K	366 sitios CpG <i>NR2E1</i> , <i>CHRNA2</i> , <i>GRM7</i> , <i>DBH</i>	Procesos cognitivos	Labonte et al., 2013
Corteza prefrontal	25 casos 28 controles	No reportada	Illumina Human Methylation 27 BeadChip	<i>EYA2</i> , <i>MEGF11</i> , <i>LMNA</i> , <i>GLUD1</i>	Ciclo celular, muerte celular	Haghighi et al., 2014
Prefrontal	23 Casos 25 Controles	Europea	Illumina Human Methylation 450 BeadChip, Secuenciación por bisulfito	<i>ATP8A1</i> <i>LOC153328</i> <i>KCNAB2</i> <i>SKA2</i>	ATP-hidrólisis, Canales de potasio regulados por voltaje, Unión de microtúbulos	Guintivano et al., 2014
BA 8/9	76 casos 17 controles	Europea	Secuenciación de unión a metilación 2	115 regiones <i>GRIK2</i> , <i>BEGAIN</i>	Sistema Glutamatérgico, Sistema inmune	Nagy et al., 2015
BA 10	6 casos 6 Controles	Europea	Illumina Human Methylation 450 BeadChip	<i>APLP2</i> , <i>BDNF</i> , <i>HTR1A</i> , <i>NUAK1</i> , <i>PHACTR3</i> , <i>SLC6A4</i> , <i>SYN2</i> y <i>SYNE2</i>	Acetilación, Splicing alternativo, citoplasma	Schneider et al., 2015
Corteza medio orbito frontal	22 casos (heroína) 28 Controles	Europea	Illumina Human Methylation 450 BeadChip, Secuenciación por bisulfito	454 sitios CpG	Axogénesis, Factores de transcripción y regulación génica	Kozlenkov et al. 2017
BA11, BA25	20 casos 20 controles	Europea	Illumina Human Methylation 450 BeadChip,	<i>PSORS1C3</i> <i>DNAJC15</i> <i>SNAI3</i>	Desarrollo del SNC, función mitocondrial, regulación del sistema inmune	Murphy et al., 2017

BA9	9 casos 9 Controles	Eslovenia	Secuenciación por bisulfito Illumina HiSeq 3000	106 CpG <i>ZNF714</i> <i>NRIP3</i>	-	Kouter et al., 2019
Corteza Prefrontal	211 casos	Europea	Illumina Human Methylation 450 BeadChip, Infinium Methylation EPIC BeadChip	CpGs en <i>ELAVL4</i> , 4 regions en <i>WRB</i> , <i>PSORS1C3</i> <i>LGALS1</i>	Neurodesarrollo Sistema inmunitario	Policicchio et al., 2020

---

### 3. Justificación

Actualmente la mortalidad por suicidio está en incremento a nivel mundial y la mayoría de muertes se concentran en países en vías de desarrollo, posicionándose como problema de salud pública. La etiología del suicidio se desconoce, aunque se han descrito numerosas variables de riesgo sociodemográficas y clínicas, sin embargo, es necesario aun dilucidar los factores moleculares que lo conducen.

Aún se están realizando investigaciones para entender los mecanismos moleculares asociados a la etiología del suicidio. Una estrategia que se ha utilizado han sido los estudios de asociación genética. A pesar de los grandes esfuerzos en esta área, se considera que estos solo explican una pequeña parte de la gran etiología del suicidio y que otras variables podrían tener un mayor efecto regulador. Estudios recientes sugieren que las alteraciones epigenéticas podrían desempeñar un papel relevante. De hecho, se ha reportado que existen alteraciones en los patrones de metilación de genes del sistema de comunicación y plasticidad celular de genes que constituyen la corteza prefrontal, región neuroanatómica altamente implicada en el suicidio. Sin embargo, la mayoría de esto estudios no han explorado simultáneamente los efectos de los cambios del metiloma en el transcriptoma y tampoco se han descrito dichas alteraciones en población Mexicana.

Por esta razón, fue necesario conducir una investigación que documente alteraciones en los patrones de metilación del genoma y su efecto en el transcriptoma de una zona neuroanatómica relevante para el suicidio en población

Mexicana. Esto ayudará a entender los mecanismos epigenéticos que subyacen a esta conducta.

#### **4. Objetivo general**

Identificar en muestras de la corteza prefrontal dorsolateral de casos de suicidio, las alteraciones en el metiloma y su concordancia con cambios en el transcriptoma.

##### **4.1 Objetivos específicos**

1. Determinar las diferencias del transcriptoma de la corteza prefrontal dorsolateral entre casos de suicidio y controles.
2. Identificar las diferencias en el metiloma de la corteza prefrontal dorsolateral entre casos de suicidio y controles.
3. Determinar las regiones génicas concordantes de cambios en el metiloma y transcriptoma.
4. Identificar las vías de señalización de genes cuya regulación epigenética y niveles de expresión se encuentren alterados en los casos de suicidio.

##### **4.2. Pregunta de investigación**

¿Cuáles son los genes que presentan concordancia entre cambios en el metiloma y transcriptoma de la corteza prefrontal dorsolateral en sujetos con causa de muerte por suicidio?

### **4.3 Hipótesis**

Se observará un cambio en el perfil de metilación de genes que constituyen la corteza prefrontal de sujetos con causa de muerte por suicidio, al ser comparados con los resultados obtenidos de muestras de sujetos con otra causa de muerte. Estas alteraciones se asociarán a cambios en el transcriptoma.

## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1 Consideraciones éticas**

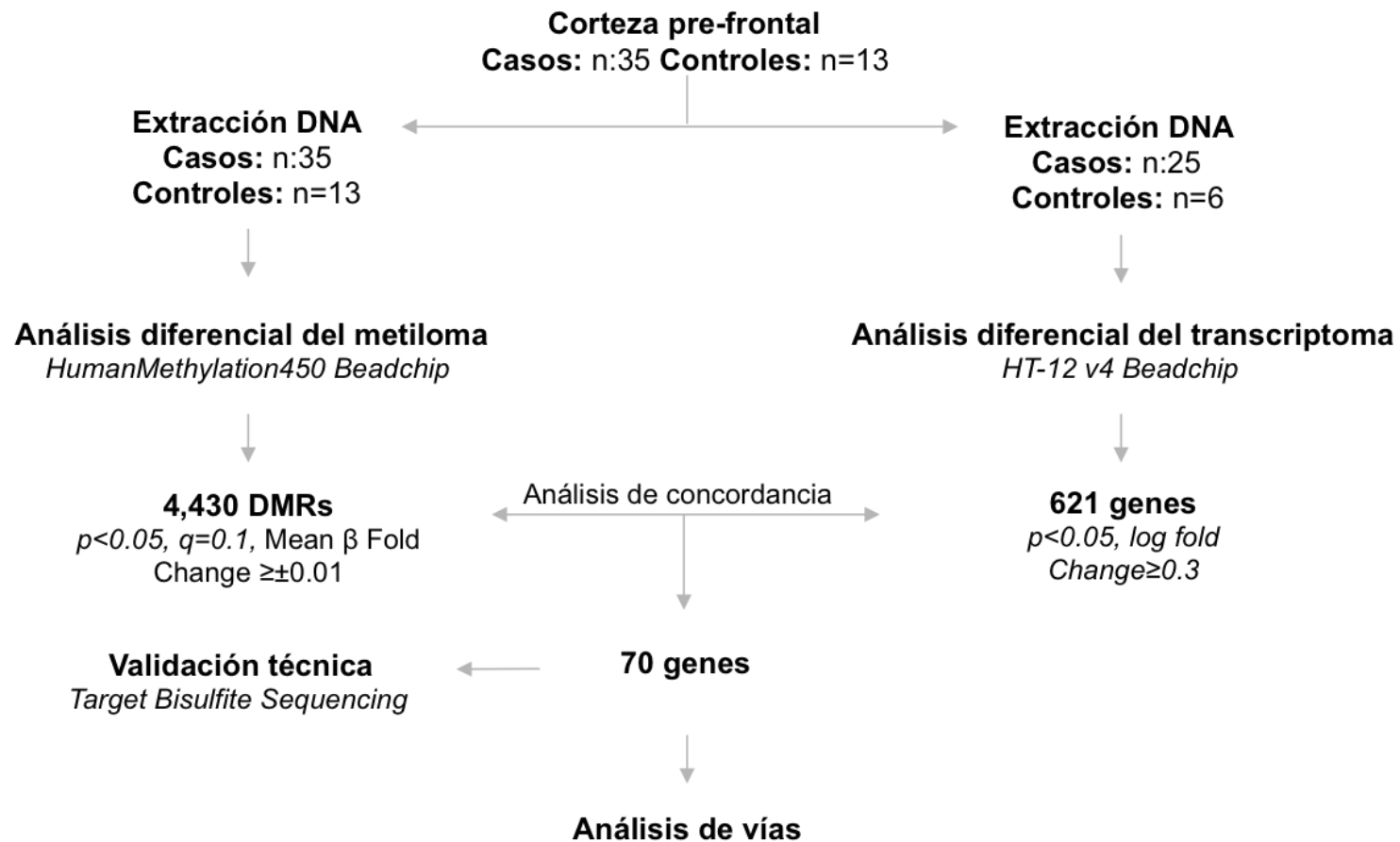
Todos y cada uno de los procedimientos que se realizaron en este estudio fueron revisados y aprobados por la Comité de Ética en Investigación del Instituto de Ciencias Forenses de la Ciudad de México (INCIFO) con el No. de dictamen CEI 017/2016 y por el Comité de Ética en Investigación del INMEGEN con el No. de dictamen CEI 2016/33.

### **5.2 Estrategia experimental**

Este es un estudio de tipo observacional, transversal, comparativo de casos y controles con un muestreo no probabilístico por conveniencia, donde para cumplir con los objetivos planteados se diseñó la estrategia experimental que se muestra en la **Fig. 1**. De manera general se compararon los perfiles de metilación y transcripción del ADN extraído de la corteza prefrontal de muestras provenientes de cadáveres con causa de muerte por suicidio (casos) y cadáveres con causa de muerte ajena al suicidio (controles), los cuales fueron pareados por edad, mecanismo de muerte y resultados en exámenes toxicológicos. Se identificaron



aquellos genes concordantes con alteraciones en la metilación y transcripción, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías ontológicas y se seleccionó una región con mayor implicación biológica para ser validada técnicamente.



**Fig. 1. Estrategia experimental.** Estrategia para el análisis de metilación y expresión diferenciales en la corteza pre-frontal dorsolateral de casos de suicidio.

### 5.3 Evaluación y selección de sujetos

Las muestras utilizadas en esta investigación fueron obtenidas a través del Instituto de Ciencias Forenses del Tribunal Superior de Justicia de la Ciudad de México (INCIFO). Se identificaron cadáveres con causa de muerte por suicidio para formar el grupo “casos” y cadáveres con causa de muerte ajena al suicidio para conformar el grupo “control”, empleando los siguientes criterios de selección:

- **Criterios de Inclusión:** Para ambos grupos se consideraron hombres de entre 19 a 65 años de edad, originarios y residentes de la Ciudad de México. Para el grupo de casos, la causa de muerte determinada fue asfixia por ahorcamiento o perforación por arma de fuego asociada a suicidio, mientras que para el grupo control se consideraron muertes accidentales, homicidios por asfixia, perforación por arma de fuego y muertes naturales.
- **Criterios de exclusión:** Para ambos grupos de estudio se excluyeron intervalos post-mortem mayores a 24 horas, cadáveres no reconocidos y causa de muerte no determinada.
- **Criterios de eliminación:** Para ambos grupos se consideraron como criterios de eliminación que los expedientes médicos legales se encontraran incompletos o que el ADN o ARN extraído de la muestra no pasara las pruebas de calidad deseadas para el microarreglo.

#### **5.4 Fuente de información y cuestionario de recolección de datos**

Desarrollamos un cuestionario de colección de datos para registrar las variables clínicas y demográficas. Las variables demográficas registradas incluyeron edad, ocupación, estatus marital, mientras que las variables clínicas incluyeron antecedentes familiares psiquiátricos, resultados de examen toxicológico, antecedentes de conducta suicida y padecimientos psiquiátricos. A través de un grupo interdisciplinario de Psiquiatría, Psicología, Patología forense y Criminalística, realizamos estimaciones diagnósticas psiquiátricas retrospectivas de acuerdo con el DSM-5. Esta información fue extraída del expediente médico-legal, el cual fue consultado dentro de las Instalaciones del INCIFO. Dicho expediente está conformado por las declaraciones de testigos, familiares, reporte de autopsia forense, examen toxicológico, notas clínicas hospitalarias, investigaciones policíacas y certificado de defunción. Los detalles del cuestionario y procedimiento pueden ser consultados en Romero-Pimentel et al., (2018). Los datos demográficos y clínicos fueron comparados entre grupos y considerados para los análisis finales.

#### **5.5 Obtención de muestras y almacenamiento**

Las muestras fueron obtenidas durante el procedimiento de autopsia. La identificación y disección de la región neuroanatomía (BA9) fue realizada por un experto en histopatología celular, el cual utilizó como referencia mapas neuroanatómicos (Nolte 2002 y Haines 2000). Se utilizaron como referencias anatómicas la segunda circunvolución prefrontal y el giro precentral, donde se

diseccionaron 5cm<sup>3</sup> de tejido cerebral. El tejido fue colocado en tubos identificados con número único por muestra. Posteriormente, los tubos fueron congelados y almacenados a -4°C para su posterior transportación. El almacenamiento a -80°C, la extracción de ácidos nucleicos, el análisis de expresión y metilación se realizó en el laboratorio de Genómica de Enfermedades Psiquiátricas y Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Todas las muestras fueron obtenidas por personal calificado, cumpliendo con los requisitos de bioseguridad y material estéril.

## **5.6 Procedimientos Experimentales**

### **5.6.1 Extracción de ácidos nucleicos**

- **Extracción de ARN**

La extracción total del ARN se realizó por el método de Trizol y con el Kit RNA Easy de Qiagen (Life Technologies, INC). Se siguieron las indicaciones establecidas por el proveedor. El ARN obtenido se hidrató con agua libre de ARNsas.

- **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó con un Kit comercial basado en el uso de columnas de afinidad (QIAamp DNA Mini Kit), siguiendo las especificaciones del proveedor. Concisamente, se comenzó la lisis del tejido añadiendo 20µL de proteinasa K y 180 µL de buffer ATL e incubamos a 56° C por 3 horas, hasta que el tejido se encontrara completamente lisado. Posteriormente, añadimos 200 µL de Buffer AL, y se incubó a 70°C por 10 minutos. A continuación, al homogenizado se

le añadió 200  $\mu$ L de etanol y se transfirió a la columna de afinidad, centrifugándolo a 8,000 rpm por 1 minuto. Después de decantar los desechos celulares, se transfirió la columna a un tubo nuevo, donde fue lavado con 500  $\mu$ L de los amortiguadores AW1 y AW2. Posteriormente, las columnas fueron transferidas a un tubo nuevo, donde se eluyó el ADN con 50 $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Finalmente, se centrifugó el ADN y se colectó para su posterior cuantificación y dilución en soluciones de trabajo a una concentración de 60 ng/ $\mu$ L. Las muestras fueron almacenadas a 4°C.

### **5.6.2 Cuantificación e integridad de ácidos nucleicos**

Los ácidos nucleicos fueron cuantificados con el espectrofotómetro de la marca NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) obteniendo los datos de concentración en ng/ $\mu$ L y los ratios de absorbancias 260/280 y 260/230 nm mayores a 1,8 como índice de calidad. Se verificó la integridad del ADN genómico mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1%, usando TBE 1 X (Tris-Borato-EDTA) y el colorante EZ-vision® (Amresco Inc., USA). Se corrió a 80 V, durante 45 min. Por otro lado, la integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis digital en un Bioanilizador 2100 (Agilent). La calidad fue estimada en unidades RIN (*ARN Integrity Number*), en una escala de 1 al 10, 1 indica totalmente degradado y 10 integro, las muestras utilizadas presentaron un RIN superior a 6.

### **5.6.3 Obtención del transcriptoma**

Una vez extraído el ARN de las muestras de estudio, los perfiles de expresión se identificaron a través del microarreglo Human HT-12 v4 Expression Beadchip, el cual contiene más de 47 mil sondas que analiza el transcriptoma anotado en el 2009, el cual es representativo a más de 20,000 genes. Las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo estándar del fabricante Illumina.

### **5.6.4 Obtención del metiloma**

Los perfiles de metilación genómico fueron cuantificados mediante el chip *Illumina Infinetum Human Methylation 450 Beadchip*. Este microarreglo contiene más de 480,000 sondas en sitios CpG que abarcan más de 20,000 genes humanos a una resolución de un nucleótido, cubriendo regiones promotoras génicas, sitios 5'UTR, primer exón, y 3'UTR, además de sitios CpG ubicados fuera de las islas y regiones promotoras de miRNA, entre otras.

Para identificar aquellas citosinas metiladas de las no metiladas, el microarreglo se basa en la técnica de modificación de ADN con bisulfito de sodio, por lo que el ADN extraído de las muestras cerebrales de estudio fue convertido con Bisulfito mediante el kit EZ DNA metylation (Zymo Research). La técnica convierte a las citosinas no-metiladas en uracilos mediante el proceso de deaminación, mientras que las citosinas metiladas son resistentes a la reacción y permanecen como citosina, lo que permite distinguir el ADN metilado con una amplificación PCR y un análisis posterior de los productos obtenidos en el proceso. Durante la amplificación PCR, las citosinas no-metiladas se amplifican como timina y las citosinas-metiladas amplifican como citosina. A continuación, se

amplificó, fragmentó enzimáticamente y se hibridó el ADN modificado de acuerdo con el Protocolo del fabricante “Infinitem Assay for Methylation” de la compañía Illumina Inc, específico para el Human Methylation 450k BeadChip.

El procesamiento de las muestras se realizó de manera semi-automatizada en robots mecánicos de la marca Tecan (Modelo Freedom EVO). Las muestras hibridadas al microarreglo son marcadas y mediante una extensión alelo específica que incorpora marcadores fluorescentes para determinar la citosina o el uracilo presente en el locus evaluado. La fluorescencia obtenida fue leída a través del escáner iScan, excitando los fluoróforos acoplados a los nucleótidos mediante láseres que emiten energía que fueron capturados a diferentes longitudes de onda por los detectores del equipo. Las imágenes, longitudes de onda e intensidades son transformadas a datos cuantitativos mediante el programa GenomeStudio v3.2 (Illumina), obteniendo valores normalizados de  $\beta$  que van en un continuo de 0 (no metilado) a 1 (metilado) (**Fig.2**).

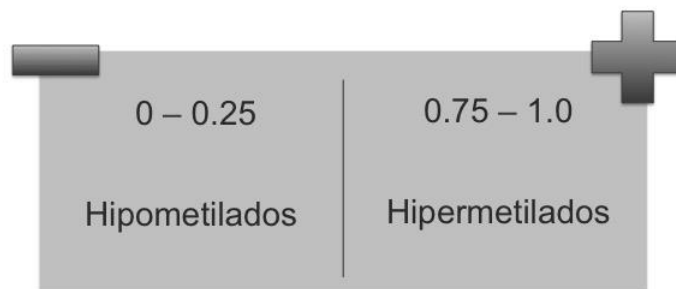
$$Beta_i = \frac{\max(y_{i,metil}, 0)}{\max(y_{i,nometil}, 0) + \max(y_{i,metil}, 0) + \alpha}$$

Donde;

$y_{i,nometil}$  = Intensidad de las sondas no metiladas

$y_{i,metil}$  = Intensidad de las sondas metiladas

$\alpha = 100$





**Fig.2. Definición de valor de beta ( $\beta$ ).** B es el radio entre la intensidad de la sonda metilada y las intensidades totales (suma de sondas metiladas y no metiladas).

## **5.7 Análisis estadísticos y Pre-procesamiento de los datos genómicos**

Los análisis del presente estudio se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Genómica Computacional del Instituto Nacional de Medicina Genómica y el Grupo de Estudios de Suicidio de la Universidad de McGill, Canadá. Las características descriptivas de la muestra fueron analizadas mediante estadística descriptiva, se usaron medidas de tendencia central y de dispersión de acuerdo con la distribución de datos. El reprocesamiento, análisis estadísticos de los microarreglos y gráficas fueron realizados a través del programa R CRAN Project.

### **5.7.1 Pre-procesamiento del Microarreglo de expresión HT-12 BeadChip**

El pre-procesamiento del microarreglo de expresión se realizó con el paquete Limma de Bioconductor (Ritchie et al., 2015). Este paso consiste en comprobar la calidad del procesamiento de los microarreglos, lo que incluye: detección de señales de sondas, corrección de ruido de fondo de la fluorescencia para eliminar las señales no específicas, normalización entre valores de fluorescencia y entre los distintos microarreglos para eliminar diferencias técnicas, identificación y corrección de efectos de lote, normalización de datos y filtrado de información. Las sondas con un valor de detección de  $p < 0.01$  en al menos el 20% de las muestras fueron incluidas en el presente estudio. Se eliminaron las sondas con bajos niveles de detección, reactividad cruzada y sitios de polimorfismos de un nucleótido. En total 27,499 sondas fueron incluidas, las cuales representan transcritos ubicados en sitios a lo largo del genoma.

### **5.7.2 Pre-procesamiento del Microarreglo Human Methylation 450k**

El pre-procesamiento del microarreglo de metilación se realizó principalmente siguiendo la metodología del protocolo *Chip Analysis Methylation Pipeline* (ChAMP) de Bioconductor (Morris et al., 2014). Como primer paso se evaluaron los controles de calidad del microarreglo (QC, por sus siglas en inglés), esto mediante el trazado de las medianas logarítmicas de las intensidades de las sondas metiladas y no metiladas. Se valoraron las lecturas de detección de sondas y para los procesos de hibridación, extensión, especificidad y de conversión por bisulfito I y II. Se eliminaron las sondas con bajos niveles de detección, reactividad cruzada y sitios de polimorfismos de un nucleótido. En total 474,958 sondas fueron incluidas, las cuales se encuentran ubicadas en sitios a lo largo del genoma.

Los valores de  $B$  ( $\beta$ ) se calcularon como el ratio de la señal metilada a la suma de las señales no metiladas y señales metiladas de cada sitio CpG y normalizadas. Los valores  $\beta$  transformados en  $\log_2$  se utilizaron para el resto de los pasos del procesamiento, los cuales son reportados como  $\beta$ , tal como lo recomienda Du et al., (2010). Los efectos de lote y las posibles co-variables fueron detectados utilizando el análisis de descomposición de un solo valor. Los efectos de lote identificados fueron corregidos antes del análisis de metilación diferencial.

### **5.7.3 Análisis diferencial del transcriptoma**

Con la finalidad de identificar diferencias en los perfiles de expresión entre nuestros grupos de estudio, realizamos un análisis de contraste a través del paquete Limma de Bioconductor (Richie et al., 2015). Limma modela la expresión

génica a través de modelos lineales generales, es una prueba de diferencia de medias con ajuste para múltiples comparaciones a través del método Benjamin-Hochberg. Se consideraron aquellas sondas con expresión diferencial que mostraran un cambio de al menos  $\pm 0.3$  Log Fold Change, valor ajustado de  $p < 0.03$  y adhiriendo una robustez estadística de corrección de múltiples comparaciones (FDR) con la prueba Benjamin-Hochberg=0.05.

#### **5.7.4 Análisis diferencial del metiloma**

Con la finalidad de identificar diferencias en el metiloma de casos y controles realizamos un análisis de contraste de regresión lineal. Los datos fueron abordados a través de dos estrategias de estudio:

- Identificamos sitios puntuales en el genoma diferencialmente metilados (DMPs, por sus siglas en ingles), tomando como punto de corte el valor de  $p < 5 \times 10^{-5}$  y adhiriendo una robustez estadística de corrección de múltiples comparaciones (FDR) con la prueba Benjamini-Hochberg de 0.1. Posteriormente, para disminuir el número de sitios significativos y para identificar las diferencias con mayor relevancia biológica, aplicamos un punto de corte de  $\pm 2\%$  en el cambio de metilación ( $\Delta\beta$ ) entre casos y controles.

- Identificamos las regiones genómicas diferencialmente metiladas (DMRs, por sus siglas en ingles), utilizando el paquete *DMRCate* de *Bioconductor*, fijamos el punto de corte el valor de  $p < 5 \times 10^{-15}$  corregido por el método de múltiples comparaciones de Benjamini-Hochberg con un FDR de 0.1. Posteriormente, para identificar los DMRs con mayor relevancia biológica aplicamos un valor de corte del 1% en la media del valor de metilación por región (Mean Beta FoldChange).

Es importante analizar las regiones DMR ya que se ha propuesto que probablemente tienen mayor relevancia biológica en comparación al análisis de posiciones genómicas aisladas (Jones, 2012).

- Método de asignación de sondas a genes

Para identificar los genes anotados en cada sonda del microarreglo utilizamos la base de datos *Methylation HumanBeadChip 450* (versión Ilm12) basado en el genoma de referencia Hg19 de Illumina, la cual asigna el nombre del gen más cercano a cada sonda.

#### **5.7.5. Análisis de efecto de confusión por composición celular de las muestras**

Para probar la posibilidad de factores de confusión que pudieran alterar los valores de nuestros resultados, se evaluó la heterogeneidad del tipo celular que conforman las muestras de estudio. Los microarreglos contienen sondas específicas para estimar las composiciones de las proporciones celulares, tal como lo sugiere (Guintivano, Aryee, y Kaminsky, 2013). Con este algoritmo realizamos una comparación entre casos y controles.

#### **5.7.6. Análisis de concordancia entre genes diferencialmente expresados y regiones genómicas diferencialmente metiladas.**

Para identificar el posible impacto de la metilación génica en la expresión de sus transcritos, realizamos un análisis de superposición de datos a través de diagramas de Venn. Estos diagramas se utilizan para mostrar relaciones matemáticas o lógicas entre diferentes grupos de conjuntos, en este caso, listado de genes. Se consideró el conjunto de datos A como genes con cambios de

expresión, el conjunto de datos B como aquellos con cambios en metilación, mientras que en la intersección se consideraron a los genes con cambios en metilación y expresión. Finalmente, se calculó la significancia estadística de la intersección por medio de una prueba hipergeométrica, la cual evalúa la probabilidad de ocurrencia de una intersección de un tamaño dado por casualidad, bajo la hipótesis nula de no asociación.

#### **5.7.7. Análisis de enriquecimiento genómico**

Con el objetivo de identificar las vías biológicas en las que participan los genes con cambios en expresión y metilación, se realizó un análisis de enriquecimiento de rutas biológicas a través del paquete *MetaCore database* de Thomson Reuters (ver. 6.11, build 41105, GeneGo, Thomson Reuters, USA). Metacore es una herramienta que contiene datos de genes derivados de fuentes bibliográficas y tiene la capacidad de mapear las funciones, los procesos y las enfermedades más afectadas y relacionadas a los genes identificados en el presente estudio. Los procesos biológicos identificados se listan de acuerdo con el valor de p determinado por la prueba hipergeométrica ( $p < 0.05$ ).

#### **5.7.8 Análisis de secuenciación dirigida por bisulfito para validación técnica**

Se seleccionó una región diferencialmente metilada y biológicamente relevante, ubicada en una región diferencialmente expresada para su validación técnica a través de secuenciación de bisulfito dirigida a través de la plataforma Illumina MiSeq (Chen et al., 2017). Para este propósito, las muestras de ADN de controles y casos fueron tratadas con bisulfito empleando el kit *Epiect 96 Bisulfite* (Qiagen, EE. UU.) y siguiendo las pautas del fabricante. Los oligos fueron diseñados con el

software Methyl Primer Express (ThermoFisher Scientific)(Material suplementario). Brevemente, las librerías fueron construidas a partir de ADN convertido con bisulfito en tres rondas de amplificación por PCR multiplexadas y utilizando placas de 384 pozos para evitar efectos de lotes por intra amplificación. La primera ronda de amplificación por PCR se completó utilizando los oligos dirigidos a nuestro amplicon de interés. En la segunda ronda se añadieron oligos con secuencias de unión de tipo CS1 y CS2. La ronda final de reacción de PCR fue realizada con oligos de unión P5 y P7, así como con códigos de barras de indexación únicos para cada muestra. Después de cada ronda de amplificación, se verificó su calidad a través de geles de agarosa al 2%, seguido por purificación con bolitas de metal de la marca Agencourt AMPure XP (AMPure, Beckman Coulter, Cat. #: A63881). Además, se utilizaron KAPA HiFi HotStart Uracil + (Kapa Biosystems, Cat #: KK2802) y KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) (Kapa Biosystems, Cat #: KK2602) en la primera ronda de amplificación y en las rondas dos y tres, respectivamente. Para cuantificar las concentraciones finales de las librerías, se utilizaron tres métodos diferentes (Agilent 2200 TapeStation, NanoDrop ND-1000 y qPCR). Se aseguró que todas las muestras tuvieran una molaridad óptima de 2 nM antes de cargarse en la plataforma MiSeq con el kit de ciclo V3 600 (Illumina, EE. UU.).

Tras recuperar los datos de secuenciación sin procesar, se utilizó Trimmomatic (v.0.35) para recortar las secuencias de los adaptadores (Bolger, Lohse, y Usadel 2014). Las lecturas con puntuaciones Phred <20 se eliminaron y se alinearon a través del método de Bowtie 2 (v 2.1.0). Posteriormente, se extrajeron señales de los sitios CpG metilados y no metiladas para calcular el nivel de metilación en nuestros sitios de interés. Se calcularon los niveles de metilación

promedio para todos los sitios CpG. Los resultados se analizaron mediante pruebas t de una cola. La correlación de los valores de metilación de secuenciación y de los microarreglos se evaluó con coeficientes de correlación de Pearson.

## **6. Resultados**

### **6.1 Características descriptivas de la muestra**

Se formó un banco de 150 muestras cerebrales en el laboratorio de Genómica de Enfermedades Psiquiátricas y Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Medicina Genómica del INMEGEN, del cual se eligieron 48 que cumplieran con las características requeridas para el estudio. Los casos (n=48) y controles (n=13) fueron pareados por edad, mecanismo de muerte y resultados en examen toxicólogo. Las características demográficas y clínicas se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Características clínicas y demográficas de la muestra de estudio (Media+/- error estándar).

	<b>Controles n=13</b>	<b>Casos n=35</b>	<b>Análisis Estadísticos</b>
<b>Edad</b>	32.46 +/-3.79	33.11+/-2.55	t=0.14, gl=46, p=0.89
<b>IPM (h)</b>	11.69+/-0.60	11.20+/-1.28	t=0.40, gl=46, p=0.69
<b>RIN</b>	7.2+/-0.24	7.4+/-0.28	U=57.50, p=0.39
<b>Escolaridad</b>	9.30+/-0.77	8.94+/-0.44	t=0.41, gl=46, p=0.67
<b>Ocupación</b>			
Estudiante	15.28% (n=2)	11.42%(n=4)	$X^2 = 0.14$ , gl=2, p=0.93
Empleado	76.92% (n=10)	80% (n=28)	
Desempleado	7.69% (n=1)	8.58% (n=3)	
<b>Estatus Marital</b>			
Soltero	30.77% (n=4)	60% (n=21)	$X^2 = 3.25$ , gl=1, p=0.07
Casado o Unión libre	69.23% (n=9)	40% (n=14)	
<b>Antecedentes familiares Psiquiátricos</b>			
Si	0% (n=0)	17.14% (n=6)	$X^2 = 5.00$ , gl=2, p=0.08
No	76.92% (n=10)	77.14% (n=27)	
Se ignora	23.08% (n=3)	5.71% (n=2)	
<b>Antecedentes de intento Suicida</b>			
Si	0% (n=0)	8.57% (n=3)	
No	100% (n=13)	32	
<b>Examen toxicológico</b>			
Alcohol	7.69% (n=1)	37.14% (n=13)	$X^2 = 4$ , gl=2, p=0.13
Cocaína	7.69% (n=1)	5.71% (n=2)	
Negativo	84.62% (n=11)	57.14% (n=20)	
<b>Condición Psiquiátrica (DSM-5)</b>			



Trastornos depresivos	0% (n=0)	48.15% (n=17)	$\chi^2 = 28, \text{gl}=4$ $p=0.0001$
Trastornos relacionados con sustancias	35.71% (n=5)	74.28% (n=26)	
Trastornos psicóticos	0% (n=0)	2% (n=1)	
Trastornos de la personalidad	7.14% (n=1)	5% (n=2)	
Ninguno	57.14% (n=8)	2% (n=1)	
<b>Nota Post-mortem</b>			
Si	n/a	17.14% (n=6)	
No	n/a	82.86% (n=29)	

Abreviaciones: IPM= Intervalo post-mortem, h= hora, RIN= RNA integridad numérica, gl=grados libertad. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas con t-Student, U de Mann-Whitney o Chi 2.

## 6.2 Evaluación de la calidad y cantidad de ácidos nucleicos

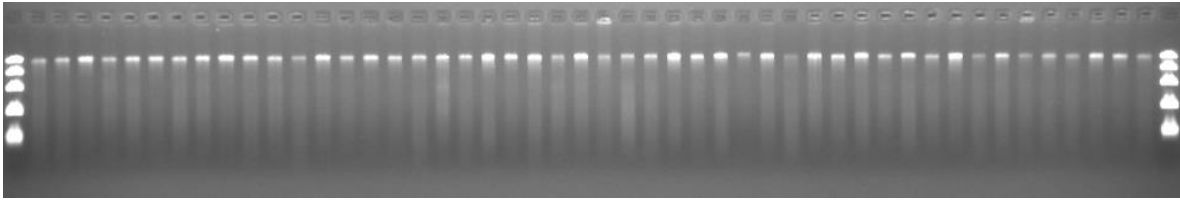
Para lograr una adecuada amplificación del ARN y ADN, se debe asegurar primero una extracción y purificación correcta. En la Tabla III se presenta la media de concentración de los ácidos nucleicos extraídos por grupos, así como los ratios de absorbancia que indican la pureza. No se encontraron diferencias para los valores obtenidos en ambos grupos ( $p > 0.05$ ).

Tabla III. Cuantificación y niveles de pureza de los ácidos nucleicos extraídos.

Grupo	[ ] Ácidos nucleicos ng/ $\mu$ l	Calidad [ ]	
		260/280	260/230
<b>ADN</b>			
<b>Controles n=13</b>	126.8 $\pm$ 11.48	2.114 $\pm$ 0.008	1.754 $\pm$ 0.044
<b>Casos n=35</b>	140.8 $\pm$ 7.05	2.096 $\pm$ 0.004	1.823 $\pm$ 0.024
<b>ARN</b>			
<b>Controles n=6</b>	50.12 $\pm$ 11.48	2.12 $\pm$ 0.06	2.05 $\pm$ 0.04
<b>Casos n=25</b>	62.56 $\pm$ 7.05	2.09 $\pm$ 0.03	2.10 $\pm$ 0.02

Nota: Los valores son expresados por su media  $\pm$  desviación estándar. No se encontraron diferencias entre los grupos para los valores reportados ( $p > 0.05$ ). La pureza del ADN y ARN es reportada con los ratios 260/280 y 260/230.

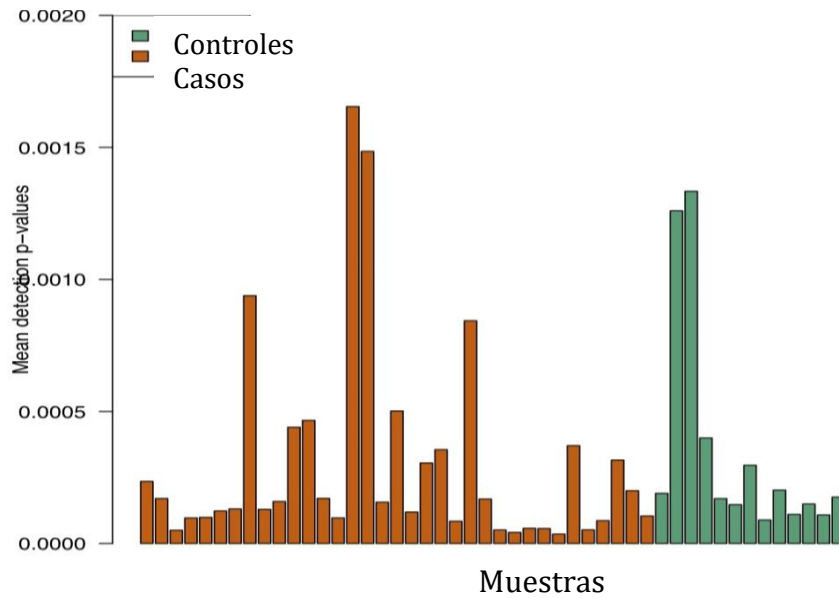
Con la finalidad de identificar la integridad del ADN genómico obtenido evaluamos cada una de las muestras a través de geles de agarosa. Identificamos una sola banda en el gel y no se observaron barridos (**Fig. 3**). Los valores obtenidos en las extracciones de ARN se muestran en la Tabla III. Se obtuvieron valores de integridad de ARN  $> 6$  por cada muestra.



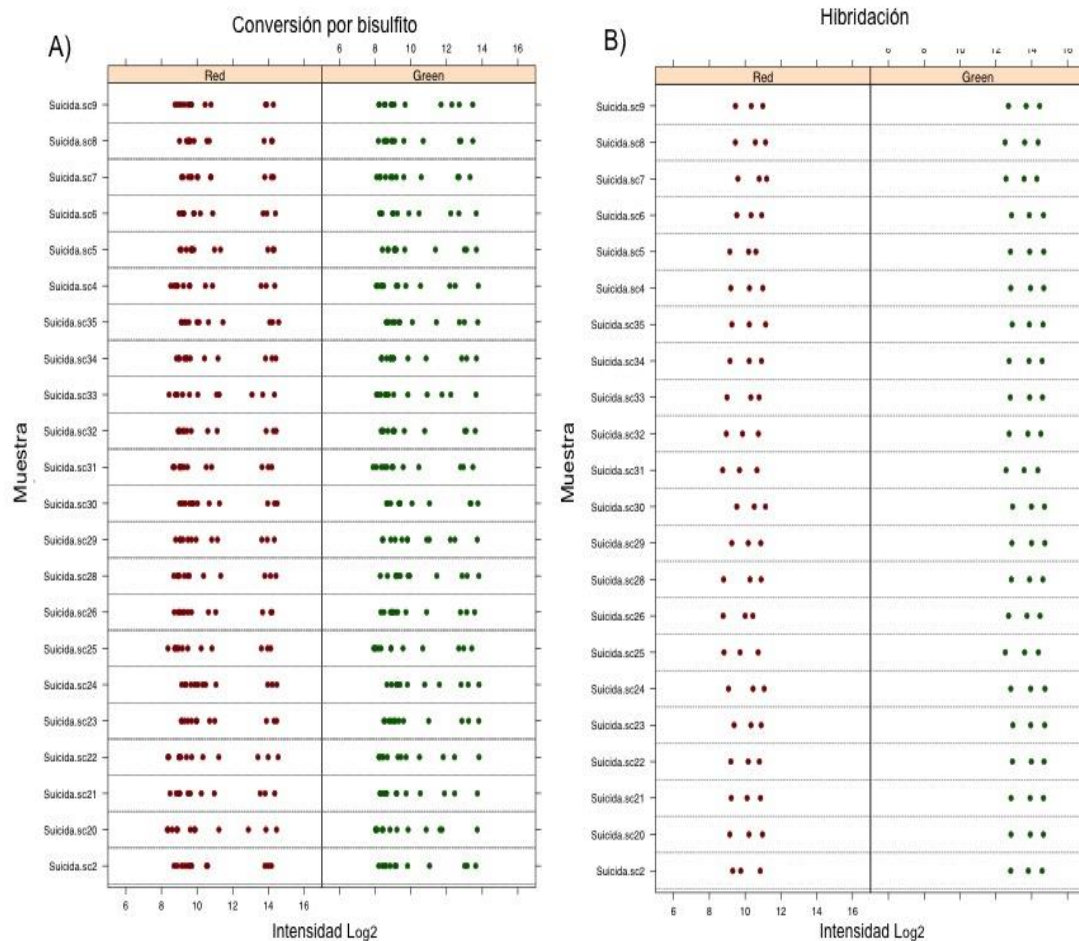
**Fig. 3. Visualización de la integridad del ADN extraído a través de gel de agarosa al 1%.**

### **6.3 Controles de Calidad de los microarreglos**

El valor de lecturas de detección de intensidades para las muestras de los microarreglos fue de  $p < 0.01$ . En la **Fig. 4** se ejemplifican los valores detectados para los microarreglos de metilación. Se identificó que los microarreglos fueron adecuadamente procesados, de manera representativa, en la **Fig. 5** ejemplifico la conversión por bisulfito e hibridación para el microarreglo de metilación. Se puede observar entre las muestras patrones homogéneos de niveles de intensidad para cada una de las sondas.



**Fig. 4. Gráfica de barras que representa la media de los valores de p de detección de sondas de las muestras del microarreglo de metilación. Todas las muestras mostraron un valor de  $p < 0.05$ .**



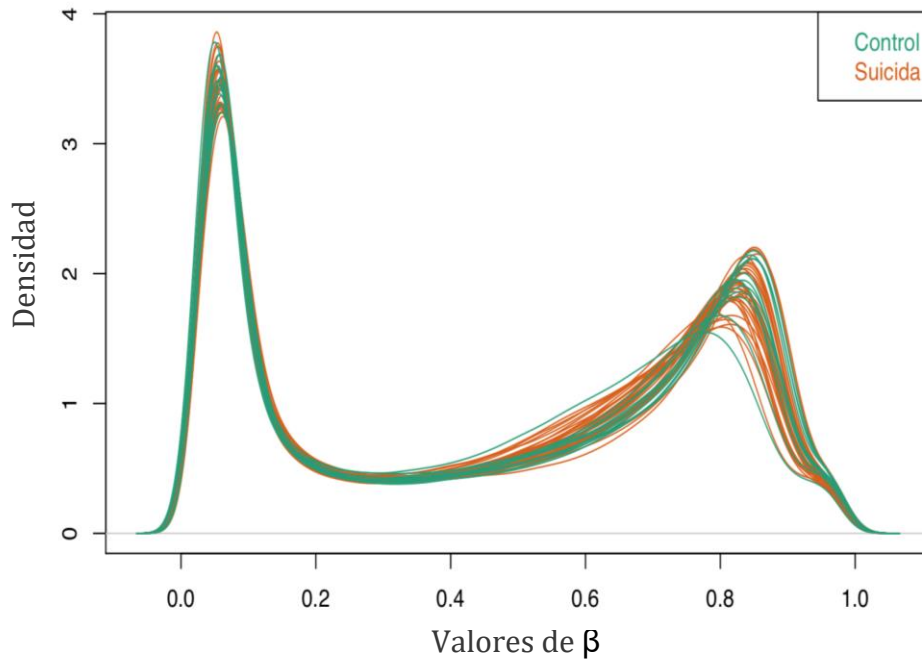
**Fig. 5. Gráficas de puntos que visualizan la media de intensidad de las sondas que representan la calidad de la conversión por bisulfito (A) e hibridación (B) del chip. Se pueden observar patrones homogéneos en la media de intensidad para cada una de las muestras, lo que sugiere correctos procesos de calidad en el manejo de la muestra.**

## 6.4 Normalización de datos

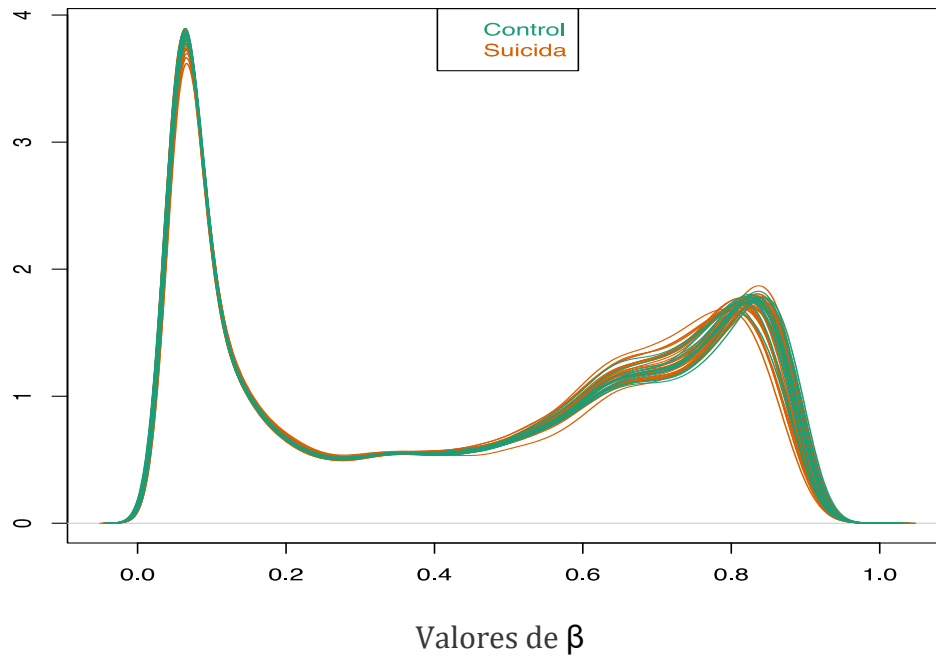
Los datos de expresión génica obtenidos a partir del ARN cerebral de las muestras de estudio fueron corregidos por efecto de lote con el algoritmo Combat (*Combating Batch Effects*). Posteriormente, normalizados a través del método de cuantiles. La normalización de cuantiles es una transformación no lineal que reemplaza cada valor situado en filas con la media de las características en todas las muestras con el mismo rango, posteriormente ordena los valores de las características dentro de cada muestra y sustituye el valor bruto con el valor promedio, finalmente reordena los valores transformados tomando en cuenta el orden original.

Los datos de metilación fueron corregidos por efecto de lote con la adaptación del algoritmo Combat y se normalizaron los valores  $\beta$  y Log Fold Change a través del método no supervisado *robust multi-Array average* (RMA, por sus siglas en inglés). En la **Fig. 6** podemos observar la gráfica de densidades de los valores de  $\beta$  antes y después de ser normalizados. Las gráficas muestran una distribución bimodal lo que indica patrones de metilación globales esperados en estos microarreglos.

### A) Datos Crudos



### B) Datos Normalizados



**Fig. 6. Gráfica de densidades de los valores de  $\beta$  para cada una de las muestras antes (arriba) y después (abajo) de ser normalizados.** El eje de las abscisas muestra los valores de  $\beta$ , equivalentes a los niveles de metilación y el eje de las ordenadas muestra la densidad de sondas del microarreglo en cada nivel de metilación.

Otro factor de confusión que puede alterar los valores de los patrones de metilación es la heterogeneidad del tipo celular que conforman las muestras. El microarreglo contiene sondas específicas para estimar la heterogeneidad de las diferentes proporciones celulares (Guintivano et al., 2013). Con esta información realizamos una comparación entre casos y controles, sin diferencias entre grupos ( $p < 0.05$ ), concluyendo que las muestras son igualmente heterogéneas.

## 6.5 Expresión genética diferencial

El fenómeno de metilación génica forma parte de los procesos de regulación de expresión, para conocer las alteraciones en las que la metilación puede influir en la expresión global de genes de la corteza prefrontal, se realizó un análisis de expresión del genoma completo a través de microarreglos. Los resultados mostraron diferencias en 621 genes en los casos de suicidio ( $p < 0.02$ , Log Fold Change  $\geq 0.3$  y FDR=0.01; **Fig. 7**), de los cuales 66.51% ( $n=413$ ) son codificantes a proteínas y el restante son no codificantes ( $n=208$ ). Además, con los perfiles de expresión de cada muestra de estudio se construyó un mapa de calor de agrupamiento jerárquico no supervisado que se muestra en la **Fig. 8**. Se puede observar que las muestras se logran agrupar de acuerdo con el estatus de control o caso.

Por otra parte, al emplear un punto de corte  $|\text{Log Fold Change}| > \pm 0.80$ , identificamos 23 genes implicados. Estos resultados se presentan en la Tabla IV. En la lista se incluyen genes que se les ha relacionado previamente con las bases genómicas del suicidio, por ejemplo: *CHR*, *EPHA2*, *MKNK1*, *MAP4K*. El listado de

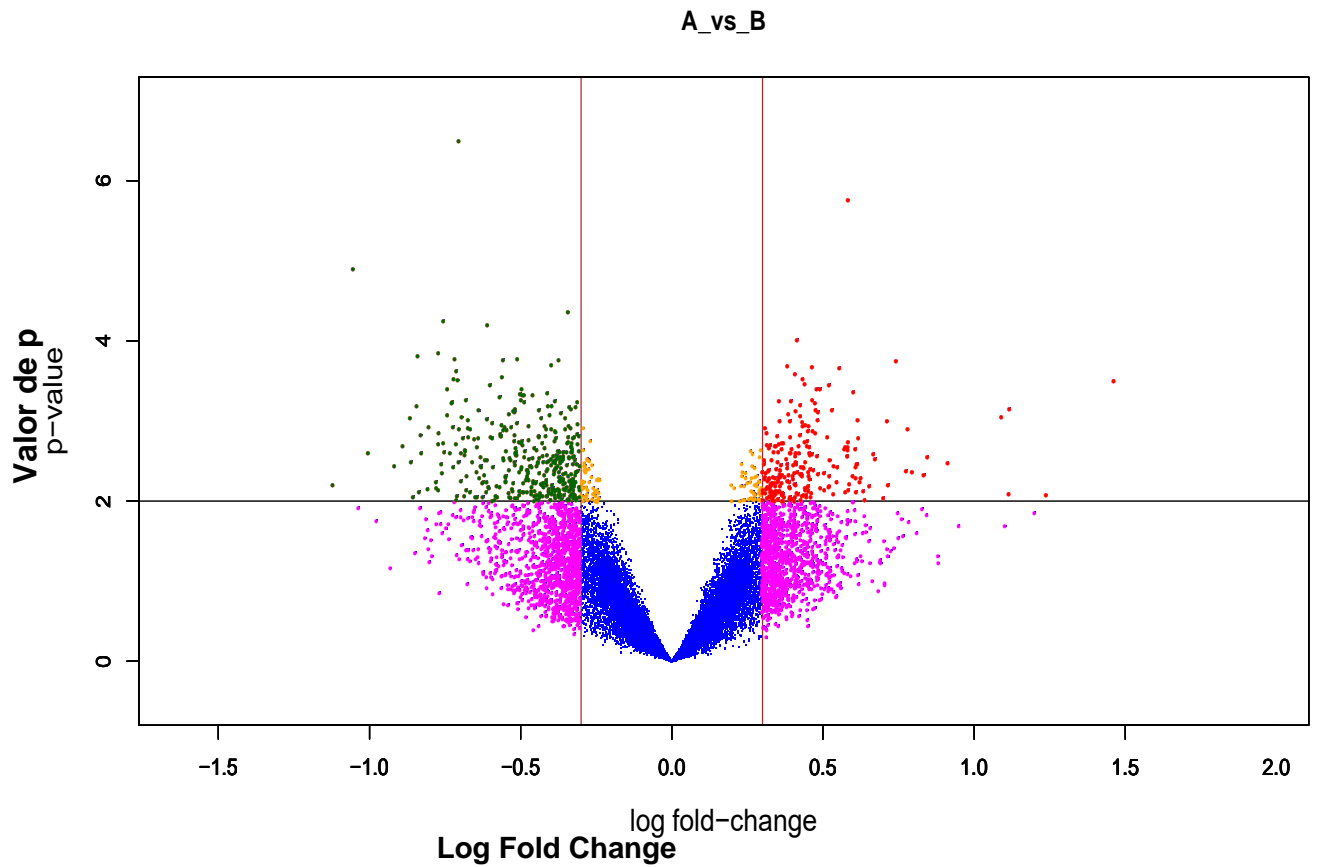


genes diferencialmente expresados fue comparado con el listado de regiones génicas diferencialmente metiladas para identificar genes que pueden ser afectados en expresión.

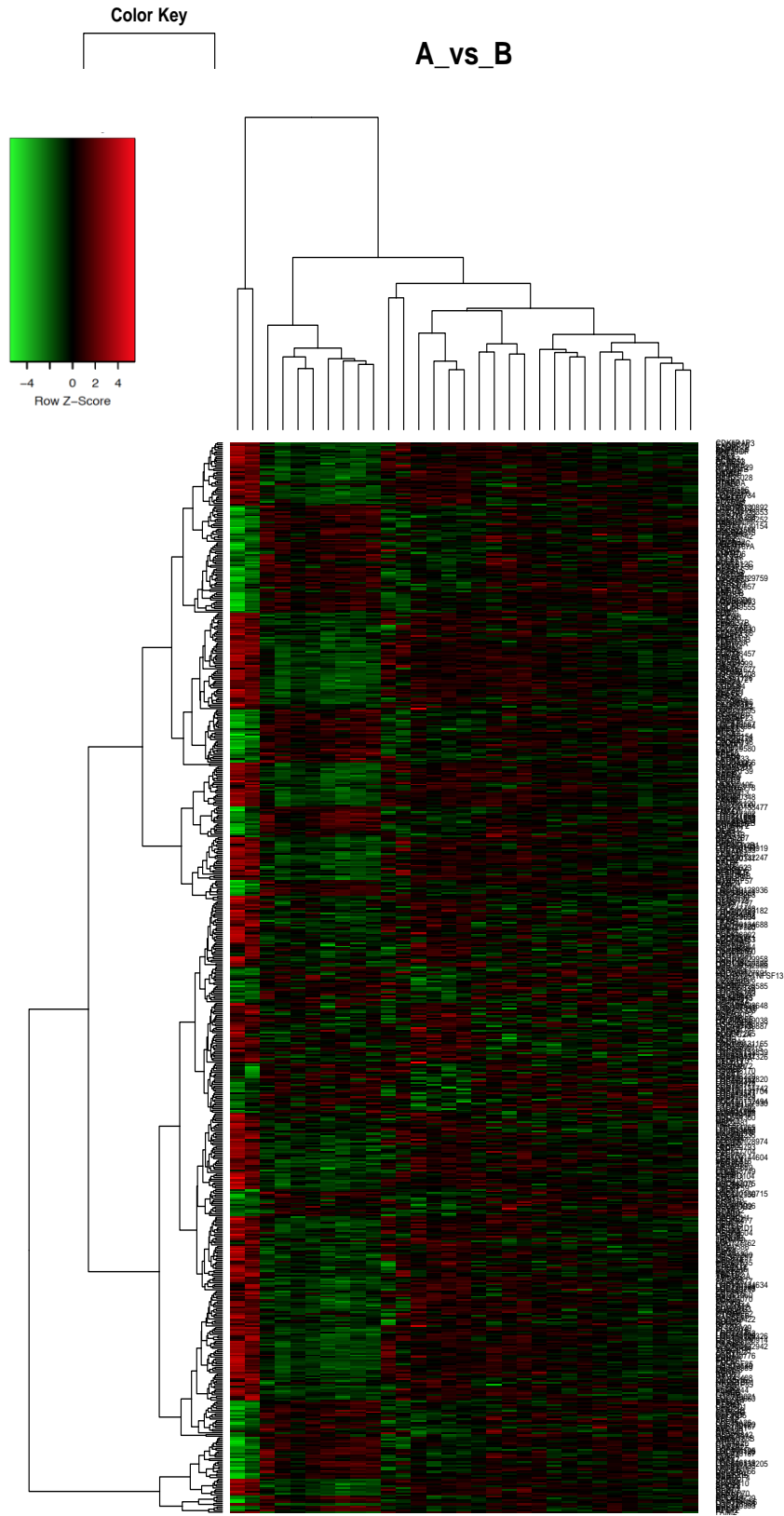
Tabla IV. Lista de genes diferencialmente expresados en el área de BA9 en la comparación casos y controles.

<b>Gen</b>	<b>Transcrito</b>	<b>logFC</b>	<b>AveExpr</b>	<b>p</b>
<i>SLN</i>	Sarcopilina	1.46	7.53	0.00
<i>HS.279842</i>	Largo no codificante	1.24	6.85	0.01
<i>CERCAM</i>	Moléculas de adhesión de células endoteliales cerebrales	-1.12	7.68	0.01
<i>CRH</i>	Hormona liberadora de la corticotropina	1.12	8.01	0.00
<i>HSPC157</i>	Largo no codificante	1.12	6.23	0.01
<i>NPAS4</i>	Proteína 4 de dominio de PAS neuronal	1.09	6.71	0.00
<i>LOC730286</i>	Se ignora	-1.05	5.74	0.00
<i>MIAT</i>	Largo no codificante	-1.00	9.59	0.00
<i>HS.184721</i>	Largo no codificante	-0.92	7.25	0.00
<i>RAPGEF4</i>	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina del rap 4	0.91	10.23	0.00
<i>STK36</i>	SerinA/Treonina Kinase 36	-0.89	8.97	0.00
<i>LOC645000</i>	Se ignora	-0.86	6.38	0.00
<i>LOC100132942</i>	Se ignora	-0.86	6.22	0.00
<i>HS.145444</i>	Largo no codificante	-0.85	7.66	0.01
<i>PID1</i>	Dominio de interacción de fosfotirosina que contiene 1	0.85	7.67	0.00
<i>OVGP1</i>	Glicoproteína Oviductal 1	-0.84	8.02	0.00
<i>LOC728457</i>	Se ignora	-0.84	7.73	0.00
<i>MMD</i>	Diferenciación asociada de Monocitos a macrófagos	0.84	10.64	0.00
<i>HS.572130</i>	Largo no codificante	-0.83	6.48	0.01
<i>RBM33</i>	Proteína 33 de Motivo de Unión a ARN	-0.83	8.99	0.00
<i>LOC286208</i>	Se ignora	-0.83	7.19	0.00
<i>PLEKHH1</i>	Homología de Pleckstrin, dominio MyTH4 y FERM que contiene H1	-0.81	9.23	0.01
<i>LOC100130914</i>	Se ignora	-0.80	6.33	0.00

Nota: LogFC= Log Fold Change, AveExpr= Valor de expresión media.



**Fig. 7. Expresión diferencial entre casos y controles.** Gráfica de volcán de la proporción de cambio (Log Fold Change) y la significancia expresada como el logaritmo base 2 del valor de p. La línea negra horizontal indica un valor de  $p=0.02$ , las líneas rojas verticales indican  $|-0.03|$  y  $|0.03|$  del Log Fold Change. Los puntos de color verde representan aquellos genes diferencialmente hipo-expresados y los genes rojos los diferencialmente híper-expresados.

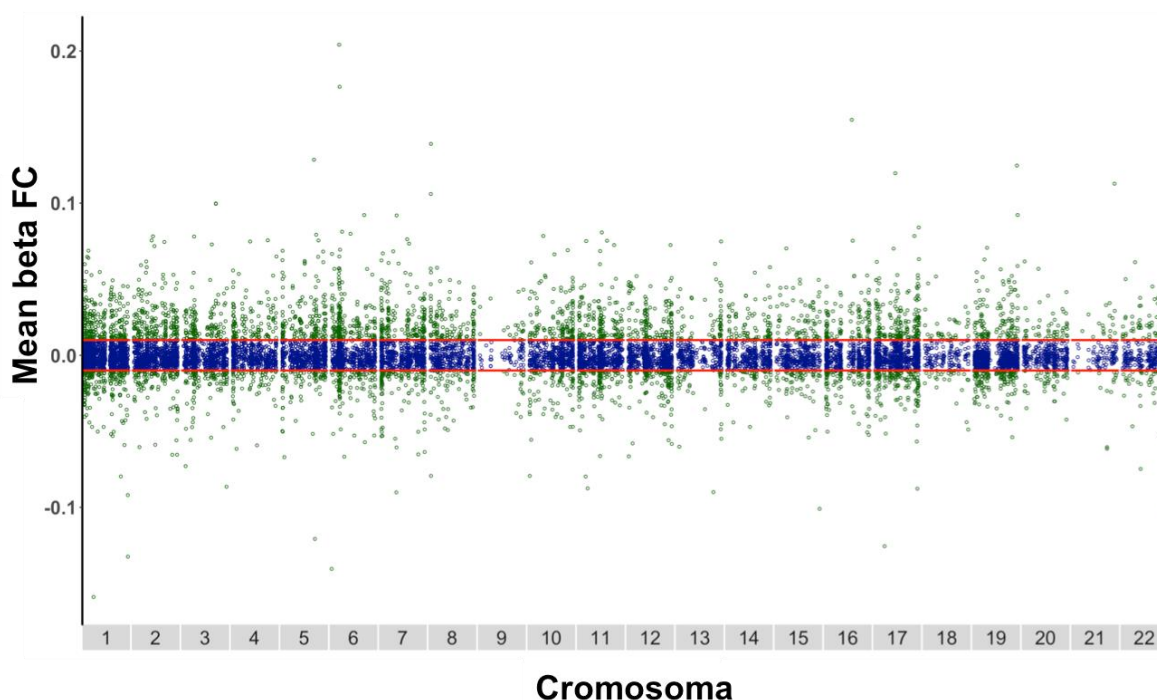


**Fig. 8. Expresión diferencial de genes de la corteza prefrontal en casos y controles.** Mapa de calor y agrupación jerárquica de las 23 muestras de estudio en función de los transcritos diferencialmente expresados. Los tonos oscuros indican expresión al alta y los tonos claros indican expresión más baja.

## 6.6 Alteraciones en el metiloma

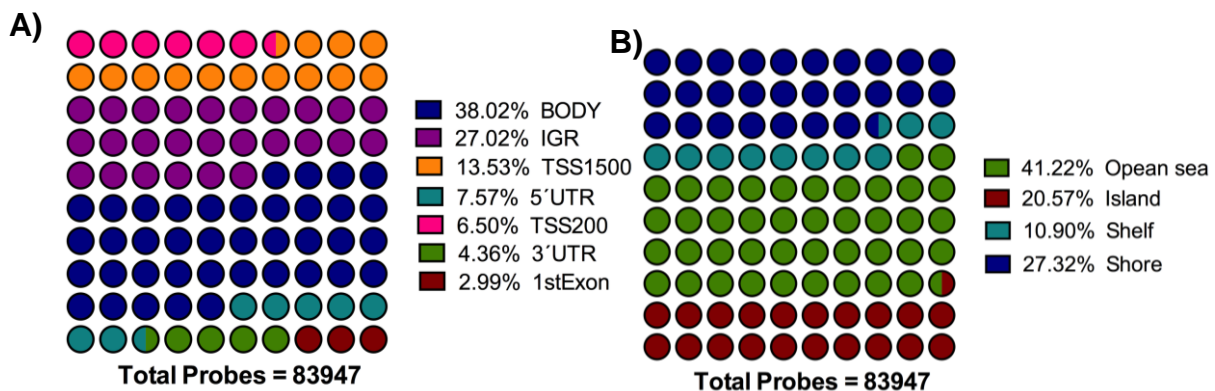
### 6.6.1 Resultados de sitios puntuales de metilación diferencial (DMPs)

Después de completar los procedimientos de control de calidad de los datos, se realizó el análisis de comparación entre casos y controles, donde identificamos 125,165 DMPs diferencialmente metilados ( $p < 5 \times 10^{-5}$ , FDR=0.10). Esto incluye sitios con diferencias muy bajas en los niveles de metilación, por ejemplo, valores de  $\beta$  por debajo del 0.0001%. Por lo tanto, aplicamos un valor de punto de corte de  $\Delta\beta$  de dos por ciento para identificar 83,947 DMPs con cambios de metilación con mayor probabilidad de ser biológicamente relevantes (**Fig. 9**).



**Fig. 9. Sitios puntuales de metilación diferencial entre casos y controles.** Los resultados se representan en puntos con los valores de la media de los niveles de metilación cambio (Mean Meta Fold Change). Las líneas rojas horizontales indican los valores de punto de corte de  $|-0.02|$  y  $|0.02|$  del Log Fold Change. 83,947 DMPs resultaron significativos (puntos de color verde).

Se identificó que el 38.02% de las alteraciones se localizan en los cuerpos génicos, el 27.02% en las regiones intergénicas (IGR) y el 13.53% en sitios cercanos al inicio de la transcripción (**Fig. 10 A**). Además, de acuerdo con la distribución de CpGs en el genoma, el 41.22% de los cambios se localizan en regiones de mar abierto y el 20.57% en islas (**Fig. 10 B**).

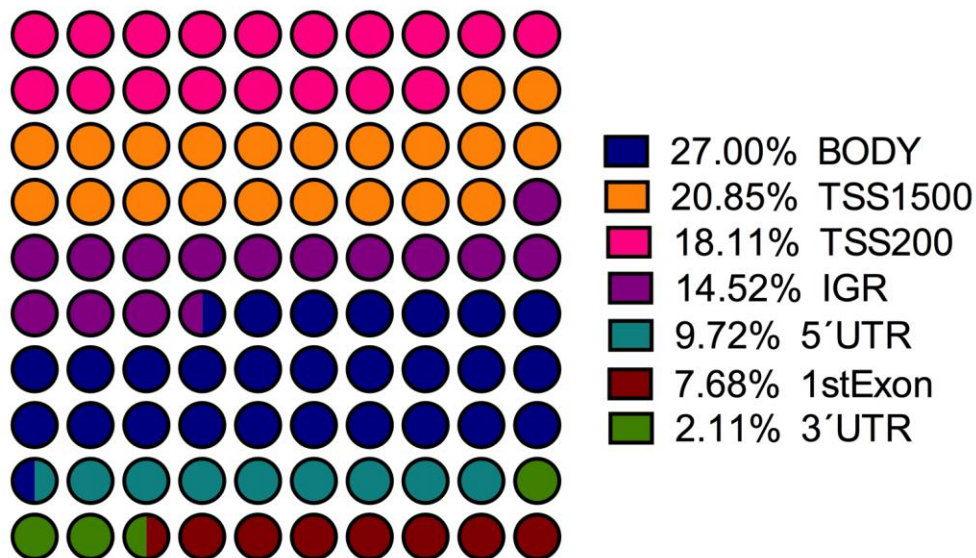


**Fig. 10. Niveles estimados de metilación diferencial en sitios puntuales CpG.** La comparación de los niveles de metilación del ADN entre casos y controles reveló efectos específicos en sitios del genoma. El mayor número de alteraciones se identificaron en los cuerpos génicos (A) y en sitios de mar abierto (B).

### 6.6.2 Regiones de metilación diferencial (DMRs)

En comparación con los cambios en sitios puntuales CpG, las alteraciones en regiones del genoma podrían tener un mayor efecto funcional en cambios de expresión de genes (Ekhardt et al., 2006). Identificamos 13,223 DMRs entre casos y controles ( $p < 0.05$ ), sin embargo, esto incluye DMR con diferencias en los valores de metilación menores al 1%. Por tanto, aplicamos un valor de punto de corte de Mean Beta Fold Change  $> \pm 0.01$ , así identificamos 4,430 DMRs con

cambios de metilación que tienen mayor posibilidad de ser biológicamente relevantes. El 27% de las alteraciones se localizaron en el cuerpo del gen, el 38.96% en sitios cercanos al inicio de la transcripción y el 14.52% en zonas intragénicas (**Fig. 11**). El DMR que mostró mayor porcentaje de cambio se encontró dentro del gen *ZFP57* (Mean Beta Fold Change  $>\pm 0.20$ ,  $p=1.22 \times 10^{-122}$ ), el cual se encontraba hipermetilado a lo largo de los 17 sitios CpG que conforman la región en los casos de suicidio. Esta región se ubica en el cromosoma seis entre las posiciones 29 648 161 y 29 649 807, cerca del sitio de inicio de la transcripción. Los 10 DMR más significativos (Mean Beta Fold Change  $>\pm <0.12$ ) se proporcionan en la Tabla V.



**Fig. 11. Niveles estimados de metilación diferencial en regiones del genoma.** La comparación de los niveles de metilación del ADN entre casos y controles reveló efectos específicos en regiones del genoma. El mayor número de alteraciones se identificaron en los cuerpos génicos.

Tabla V. Top 10 de regiones diferencialmente metiladas (DMRs) y entre casos y controles.

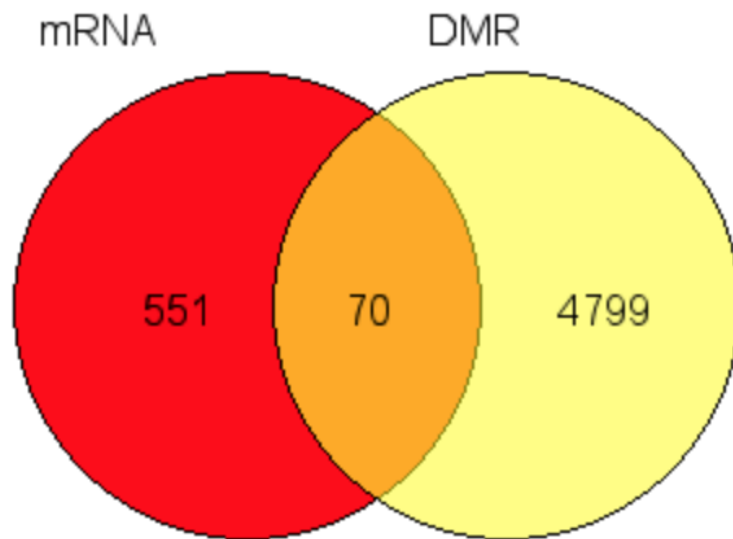
Cro	Número de CGs	Promotores	Transcrito	p	Mean B FC
<b>Hipermetilado</b>					
6	22	ZFP57	Proteína dedo de zinc 698	1.22X10 <sup>-122</sup>	0.20
6	13	POU5F1	POU Clase 5 Homebox1	2.50X10 <sup>-145</sup>	0.17
16	9	RP11	Pseudogen	3.83X10 <sup>-77</sup>	0.15
8	7	ARHGEF10	Factor de intercambio de Nucleotido Guanino Rho 10	7.24X10 <sup>-57</sup>	0.13
5	7	AC034228	Transcrito nuevo	9.60X10 <sup>-60</sup>	0.12
<b>Hipometilado</b>					
1	10	RP11	Pseudogen	4.85X10 <sup>-6</sup>	-0.15
6	8	DUSP22	Fosfatasa dual específica 22	2.24X10 <sup>6</sup>	-0.14
1	10	RP11	Pseudogen Fosfolipasa	1.08X10 <sup>-14</sup>	-0.13
17	13	PLD6	Familia D Miembro 6	1.27X10 <sup>-05</sup>	-0.12
5	15	VTRNA2	Micro RNA 886	2.02X10 <sup>-5</sup>	-0.12

Nota: Cro = número de cromosoma, FC= Fold Change

### 6.7. Alteraciones concordantes entre genes diferencialmente expresados y regiones genómicas diferencialmente metiladas.

Con el objetivo de identificar los posibles efectos de las alteraciones en los patrones de metilación sobre la expresión génica, identificamos los genes que mostraran regiones diferencialmente metiladas y cambios significativos de expresión a través de un diagrama de Venn. En la **Fig. 12** se observa que 70 genes presentan una relación metilación-expresión en los casos de suicidio en comparación con los controles ( $p=2.58^{-24}$ , prueba de probabilidad hipergeométrica

exacta). Cabe destacar que las regiones hipermetiladas con mayor cambio que tuvieron efecto en la expresión de su transcrito se localizaron dentro de los genes *CD22* y *NLRP3* ( $p=5.89^{-36}$ , Mean Beta Fold Change=0.056, FDR=0.10,  $p=8.21^{-15}$ , Mean Beta Fold Change=0.045, FDR=0.10) ; mientras que *SLC25A34* y *ADCY9* fueron los genes con mayor cambio en hipometilación y efecto en expresión ( $p = 5.47E^{-20}$ , Mean Beta Fold Change=-0.034 y  $p= -8.85^{-14}$ , Mean Beta Fold Change =-0.032,  $q=0.10$ , respectivamente). En la Tabla VI se muestra jerárquicamente los genes con mayores cambios observados, así como aquellos biológicamente relevantes para el suicidio.



**Fig. 12.** Diagrama proporcional de Venn que muestra la superposición de diferencias entre las DMP diferenciales y la expresión génica (A), los DMR y la expresión génica (B) entre los casos y los controles. Prueba de probabilidad hipergeométrica exacta  $p < 2.58^{-24}$ .



Tabla VI. Top de regiones diferencialmente metiladas y su concordancia en cambios de expresión entre casos y controles.

Gen	Transcrito	Cro	Metilación		Expresión	
			p	LFC	p	LFC
<b>Hipometilado en casos</b>						
<i>SLC25A34</i> *	Acarreador de soluto 25 miembro 34	1	5.48 <sup>-20</sup>	-0.034	0.004	-0.67
<i>ADCY9</i> <sup>+</sup>	Adenilato ciclasa 9	16	8.85 <sup>-14</sup>	-0.032	0.005	-0.42
<i>PLEKHA6</i> *	Dominio homólogo de Pleckstrin A6	1	1.27 <sup>-32</sup>	-0.025	0.003	-0.62
<i>INADL</i> <sup>+</sup>	Proteína asociada a uniones estrechas	1	3.27 <sup>-23</sup>	-0.025	0.0005	-0.31
<i>ISG20</i> <sup>+</sup>	Gen 20 del interferón estimulado por exonucleasas	15	2.45 <sup>-11</sup>	-0.023	0.006	-0.57
<b>Hipermetilado en casos</b>						
<i>CD22</i> *	Molécula CD22	1	5.89 <sup>-36</sup>	0.056	0.004	-0.3
<i>NLRP3</i> *	<i>NLR Family Pyrin Domain Containing 3</i>	22	8.21 <sup>-15</sup>	0.045	0.003	-0.43
<i>COCH</i> *	Cochlina	14	4.35 <sup>-36</sup>	0.033	0.006	0.39
<i>TUBGCP6</i> **	Complejo gamma tubulina asociado a proteína 6	1	1.80 <sup>-47</sup>	0.033	0.008	-0.36
<i>MXRA8</i> **	Remodelador de Matriz asociado 8	19	5.28 <sup>-37</sup>	0.031	0.001	-0.61
<b>Biológicamente relevantes</b>						
<i>CRH</i> **	Hormona liberadora de la corticotropina	8	3.59 <sup>-28</sup>	0.25	0.0006	1.18
<i>MKNK1</i> <sup>+</sup>	MAP cinasa interacción Serin/Teorin cinasa	1	3.31 <sup>-34</sup>	-0.01	0.001	-0.51
<i>MAP4K</i> *	Proteína cinasa mitogeno-activada 4 de interacción MAP serina cinasa/teorina cinasa	14	1.65 <sup>-79</sup>	-0.01	0.007	-0.48
<i>EPHA2</i> <sup>+</sup>	Receptor EPH 2	9	1.99 <sup>-27</sup>	0.01	0.009	-0.36

Abreviaciones: Cro, Cromosoma, LFC, Log Fold change. \* Exon, + Intron. Las regiones presentan un tamaño de 1kb.

## 6.8 Análisis de vías biológicas y enriquecimiento funcional de genes

Para investigar una posible asociación funcional de los 70 genes identificados con cambios en expresión y metilación, se realizó un análisis de enriquecimiento de rutas biológicas a través del paquete Metacore. Se eligieron las 5 vías más significativas de acuerdo con valores de  $p < 0.05$ . Los datos se abordaron con la finalidad de identificar redes específicas para procesos celulares y vías canónicas. El análisis reveló 10 genes sobre representados y asociados al suicidio: *ADCY9*, *CRH*, *NFATC4*, *ABCC8*, *HMGA1*, *KAT2A*, *EPHA2*, *TRRAP*, *CD22*, *CBLN1*.

En términos de redes de procesos celulares; inflamación regulada por el factor inhibidor de la migración de macrófagos ( $p = 9.20 \cdot 10^{-3}$ ), transducción de señales regulada por el modulador del elemento sensible al cAMP también conocido como vía CREM ( $p = 1.97 \cdot 10^{-2}$ ) y el proceso neurofisiológico regulado por la hormona liberadora de corticotropina ( $p = 3.35 \cdot 10^{-2}$ ) fueron identificadas. Además, el análisis de vías ontología genética de Metacore indicó que estos genes expresados y metilados diferencialmente también estaban altamente correlacionados con la regulación de la plasticidad sináptica ( $p = 1.02 \cdot 10^{-5}$ ), la diferenciación de células de la notocorda ( $p = 1.06 \cdot 10^{-5}$ ) y la regulación negativa de mantenimiento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica ( $p = 1.06 \cdot 10^{-5}$ ) como se muestra en la Tabla VII.

Tabla VII: Análisis de enriquecimiento de genes diferencialmente metilados y expresados asociados a suicidio. Top 5 de las rutas más importantes ordenadas por valores de p.

#	Vías de señalización	# genes	p	Min FDR	Genes
<b>Redes de procesos celulares</b>					
1	Inflamación regulada por el factor inhibidor de la migración de macrófagos	4	0.009	0.653	Adenilato ciclasa, <i>CRH</i> , Adenilato ciclasa tipo IX, <i>HMGA1</i>
2	Transducción de señales regulada por el modulador del elemento sensible al cAMP	3	0.019	0.658	Adenilato ciclasa, <i>CRH</i> , <i>NFATC4</i>
3	Proceso neurofisiológico regulado por la hormona liberadora de corticotropina	2	0.033	0.658	Adenilato ciclasa, <i>CRH</i>
4	Modificación de la cromatina de transcripción	3	0.037	0.658	<i>TRRAP</i> , <i>HMGA1</i> , <i>KAT2A</i>
5	Vía BCR de la respuesta inmune	3	0.046	0.658	<i>CD22</i> , <i>NFATC4</i> , <i>NF-AT</i>
<b>Vías ontológicas</b>					
1	Regulación de la plasticidad sináptica	8	1.00E-05	0.004	Adenilato ciclasa, <i>CRH</i> , Ephrin-A receptor, <i>S100</i> , <i>NFATC4</i> , <i>CBLN1</i> , <i>KAT2A</i> , <i>NF-AT</i>
2	Diferenciación celular de la notocordia	2	1.10E-05	0.004	Ephrin-A receptor, <i>EPHA2</i>
3	Regulación negativa de mantenimiento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica	2	1.10E-05	0.004	<i>SUR</i> , <i>ABCC8</i>
4	Regulación negativa de la migración de neuroblastos	2	1.10E-05	0.004	<i>SUR</i> , <i>ABCC8</i>
5	Regulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica	2	1.10E-05	0.004	<i>SUR</i> , <i>ABCC8</i>

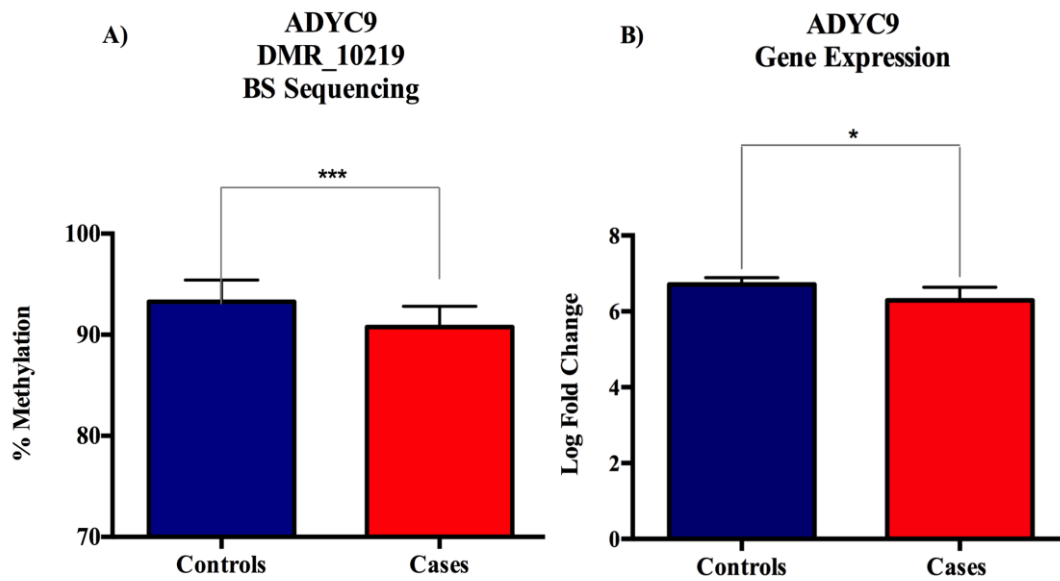
## 6.9 Validación de región diferencialmente metilada por secuenciación dirigida por de bisulfito

Por último, se identificó que dentro de los 10 genes contenidos en las vías de asociación al suicidio, el gen *ADCY9* fue el de mayor relevancia biológica al estar presente en 4 vías biológicas y tener los valores estadísticos más significativos ( $p = -8.85E-14$ , Mean Beta Fold Change=-0.032,  $q = 0.10$ ) (Tabla VIII). Por lo tanto, se seleccionó el DMR asociado a *ADCY9* para validar los datos de metilación obtenidos a través del microarreglo. Los valores de metilación de *ADCY9* fueron medidos mediante la secuenciación de la región chr16: 4102293-4103533, usando un amplicón que incluía los sitios cg00701890, cg16774375, cg02910037, cada uno ubicado dentro del DMR. En consistencia con los datos obtenidos a través de microarreglos, la secuenciación dirigida de bisulfito reveló que *ADCY9* estaba hipermetilado en los casos de suicidio en comparación con los controles (valor de  $p < 0,001$ , prueba t de Student). Además, obtuvimos un coeficiente de correlación de Pearson de  $r = 0.40$  ( $p < 0.009$ ) entre el nivel de metilación de CpGs evaluado por el método de secuenciación de bisulfito y el microarreglo (**Fig. 13**).

Tabla VIII: Lista de genes sobre representados en vías de asociación biológicas ordenados por relevancia biológica.

Genes anotados en DMRs	Transcritos	Cro	Metilación de ADN		Expresión mRNA		Número de vías de asociación
			p	LFC	p	LFC	
<i>ADCY9</i>	Adenilato ciclasa 9	16	8.85E-14	- 0.032	0.0059	-0.42	4
<i>CRH</i>	Hormona liberadora de la corticotropina	8	3.59E-28	0.026	0.0006	1.13	4
<i>NFATC4</i>	Factor nuclear 4 de células activadas T	14	6.80E-21	0.017	0.0007	1.12	3
<i>ABCC8</i>	Casete de ATP unión subfamilia C miembro 8	11	9.23E-22	0.011	0.0057	-0.55	3
<i>HMGA1</i>	Grupo de alta movilidad AT-Hook 1	6	2.47E-20	0.023	0.0088	0.33	2
<i>KAT2A</i>	Lisina Acetiltransferasa 2 <sup>a</sup>	17	3.80E-18	- 0.011	0.0012	-0.55	2
<i>EPHA2</i>	EPH Receptor 2	1	1.99E-27	0.016	0.0092	-0.36	2
<i>TRRAP</i>	Proteína de transformación/transcripción de Dominio Asociada	7	3.37E-47	- 0.013	0.0082	-0.39	1
<i>CD22</i>	CD22 Molecula	19	5.89E-36	0.056	0.0047	-0.62	1
<i>CBLN1</i>	Cerebelin 1 Precursor	16	9.80E-19	0.029	0.0058	0.33	1

Abreviaciones: Cro= Cromosoma, LFC= Log Fold Change.



**Fig. 13. Correlación de los valores de metilación en la región 10219 del gen *ADYC9* evaluada a través del microarreglo Illumina BeadChip de 480k y secuenciación dirigida de bisulfito.** A) Los gráficos de barras muestran el porcentaje de metilación de casos y controles detectados mediante la secuenciación de bisulfito dirigida. B) Los gráficos de barras muestran un cambio logarítmico de la expresión génica de casos y controles detectados mediante el BeadChip de expresión HumanHT-12 v4.

## 7. Discusión

En el presente trabajo, se identificaron las alteraciones del metiloma y su efecto en la transcripción de genes que constituyen la corteza prefrontal dorsolateral de mexicanos finados por suicidio mediante técnicas de alto rendimiento para la detección del genoma completo y análisis de enriquecimiento funcional. Además, se realizó la validación de la región génica con mayor implicación biológica en la etiología del suicidio a partir de secuenciación por bisulfito. Lo anterior es de gran interés ya que evidencias actuales indican que los mecanismos epigenéticos pueden tener un papel fundamental en el suicidio y la epigenética está aportando nuevo conocimiento para entender la interacción genético-ambiental, por lo que entender este proceso es fundamental para dilucidar las bases biológicas del suicidio.

### **Cambios en el transcriptoma de los casos de suicidio**

En la primera parte de este trabajo se investigaron los cambios de expresión del genoma que constituye la CPF en casos de suicidio. Se detectó cambios significativos en 621 transcritos, de los cuales 208 no codifican a proteínas (NCrna). Aquí se incluyó intencionalmente la regulación de los NCrna ya que son considerados como modificadores epigenéticos directos de loci (Peschansky y Wahlestedt, 2014). Los NCrna eran considerados como "DNA basura", sin embargo, actualmente se ha reconocido su participación como reguladores de la expresión génica. Hasta el momento, no se ha detectado un solo mecanismo por el cual medien sus procesos reguladores. En general, son capaces de regular genes codificantes de proteínas cercanas en *cis*, a través de la interferencia de las

proteínas que constituyen la maquinaria de transcripción. También regulan genes más distales en *trans*, a través del reclutamiento y la focalización de complejos de proteínas (Roberts et al., 2014). Pocos son los trabajos que han evaluado la implicación de NCrna en la fisiopatología del suicidio por lo que es complicado su interpretación. Punzi et al., (2014), demostró una asociación entre la regulación del gen *MARCKS* y el incremento de expresión del largo no codificante 285758 en el área de BA9. Los resultados de este estudio involucran un listado de 208 NCrna los cuales no han sido previamente asociados. Especulamos, que existe una correlación entre los componentes de genes no codificantes del transcriptoma, los cambios epigenéticos y las alteraciones en la expresión del área de BA9, sin embargo, el diseño de este estudio no nos permite probar esta asociación causal.

Respecto a la interpretación de los resultados de genes codificantes a proteínas, destacamos la sobreexpresión de la hormona liberadora de corticotropina (*CHR*), cambio que probablemente es el más replicado en la literatura (Pandey et al., 2019) y que se ha observado en el hipotálamo y la CPF de casos de suicidio (Gao y Bao, 2011; Pandey et al., 2019). Se ha propuesto que las altas concentraciones de CHR están directamente asociadas con la presencia de estrés y que provoca un desbalance en el funcionamiento del eje hipotalámico-hipófisis-adrenal. Dado que la CPF contiene neuronas secretoras de CHR y receptores sensibles a sus niveles (Herman y Cullinan, 1997; Herman et al., 2003), especulamos que probablemente al momento de la muerte los individuos atravesaban situaciones de estrés agudo o crónico lo que causó un cambio sostenido en los parámetros de CHR en la CPF.



También se identificó alteraciones en transcritos relacionados al sistema inmunitario. Por ejemplo, *MKNK1* y *MAP4K* codifican para proteínas que interactúa activadas por mitogénos, se activan en respuesta a las citosinas y están implicadas en la señalización, activación de respuestas inmunitarias, transformación y migración celular (Kyriakis et al., 2012). La alteración en el transcrito *MKNK1* fue reportada en pacientes con esquizofrenia (Goes et al., 2015) y es la primera vez que se identifica en el contexto del suicidio. Se puede inferir, que existe un posible vínculo entre la sobre expresión de *CRH* y las alteraciones en la expresión de los genes *MKNK1*, *MAP4K*, *EPHA2*, dado que ya se ha demostrado que el aumento en *CHR* tiene la capacidad de estimular respuestas en el sistema inmunitario (Pandey et al., 2019).

Si bien los datos transcriptómicos brindan información específica de lo que sucede en el cerebro al momento de la muerte, el estudio de las marcas epigenéticas nos brinda información de los procesos mediadores de regulación en periodos más largo de tiempo. Por consiguiente, el objetivo principal de este trabajo fue implicar el papel de los patrones de metilación como mecanismo de regulación génica en el contexto del suicidio.

### **Implicación del proceso de regulación epigenético de metilación en los cambios transcriptómicos de los casos de suicidio y análisis de vías biológicas y enriquecimiento funcional de genes**

En el análisis de concordancias entre las alteraciones de los perfiles de metilación y expresión se identificó numerosas regiones metiladas con tasas de cambio  $>\pm 0.01$  entre casos y controles. Este valor podría representar tasas de cambio relativamente bajas, cuestionando sí realmente existe un impacto biológico en el

fenotipo observado. Sin embargo, a diferencia de enfermedades monogénicas, donde se valores altos de cambio en un solo gen, en las enfermedades complejas y en la conducta suicida se esperan cambios pequeños en múltiples sitios. Además, estos puntos de corte son comúnmente utilizados en el contexto de enfermedades complejas (Dalman et al., 2012; Hachiya et al., 2017).

Si bien identificamos numerosos sitios puntuales de metilación diferencial con efecto en su transcripción, la discusión será centrada en las regiones diferencialmente metiladas ya que estas podrían tener un mayor efecto funcional en cambios de expresión de genes (Ekhardt et al., 2006). Se identificaron 70 regiones diferencialmente metiladas con efectos en la transcripción del RNA, las cuales se ubican en diferentes genes. El análisis de enriquecimiento de estos 70 genes reveló que 10 estaban sobrerrepresentados y que por lo tanto son biológicamente relevantes a procesos relacionados con el suicidio (*ADCY9*, *CRH*, *NFATC4*, *ABCC8*, *HMGA1*, *KAT2A*, *EPHA2*, *TRRAP*, *CD22*, *CBLN1*). De estos 10 genes, *ADCY9* apareció en el mayor número de vías. Por lo tanto, se decidió validar su resultado mediante secuenciación dirigida de bisulfito.

El gen *ADCY9* pertenece a la familia de enzimas de unión transmembranal que catalizan la formación de AMP cíclico a partir de trifosfato de adenosina (ATP) y está implicado en la señalización intracelular, su producto se ha asociado a procesos de aprendizaje, memoria, plasticidad sináptica y la neurodegeneración. Las alteraciones en la actividad de AMP cíclico han sido previamente identificadas en las plaquetas del cerebro post-mórtem en casos de suicidio (Cowburn et al., 1994; Reiach et al., 1999). En el presente estudio se encontró una regulación a la alza de *ADCY9* y una asociación con hipometilación de todos los sitios CpG que

conforman su segundo intrón. Esta hipometilación correspondió a una disminución a la expresión del ARN. Si bien la metilación en una región promotora generalmente está anticorrelacionada con su expresión, nuestros hallazgos de una correlación positiva entre la metilación y la expresión del cuerpo del gen son consistentes con otros estudios (Ball et al., 2009, Lutz et al., 2018). De acuerdo con nuestro conocimiento, alteraciones en los patrones de metilación en *ADCY9* no han sido identificadas previamente en la corteza prefrontal de casos de suicidio.

Mediante análisis bioinformáticas se identificó que *ADCY9* enriqueció funcionalmente a cuatro vías de señalización asociadas a suicidio. Hay dos de ellas que vale la pena remarcar; la vía de inflamación regulada por el factor inhibidor de la migración de macrófagos y el proceso neurofisiológico regulado por la hormona liberadora de la corticotropina. Ambas comprenden y modulan la regulación de dos sistemas cruciales en la conducta suicida que son el sistema inmunitario y el eje encargado de regular la respuesta biológica a estímulos estresantes, respectivamente.

Reportes previos han remarcado la importancia de la regulación del sistema inmunitario en la etiología del suicidio, así como los procesos de inflamación, de estos identificamos siete genes con alteraciones e involucrados en los casos de suicidio de mexicanos (*ADCY9, CRH, HMGA, NFATC4, CD22, NLRP3, MAP4K*). Las diferencias más pronunciadas se encontraron en los genes implicados en la señalización del factor de inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). Evidencia experimental sólida nos indica que MIF se produce y almacena dentro de vesículas citoplasmáticas de distintos tipos celulares, incluidos macrófagos,

células T y células dendríticas, además es liberado rápidamente cuando las células detectan a las corticotropinas (Calandra et al., 1995; Calandra y Roger 2003; Fan et al., 2014). El cortisol es una corticotropina que se liberan en presencia de estímulos estresantes de origen endógeno y exógeno y se ha demostrado que tiene la capacidad de activar las células del sistema inmunológico (Dhabhar, 2009). Además, algunos estudios han demostrado que el estrés agudo aumenta la resistencia a infecciones y favorece la activación inmunitaria innata, mientras que el estrés crónico suprime las respuestas del sistema inmunitario adaptativo a través de la disminución de células T y el aumento de la actividad inmunosupresiva (Dhabhar, 2009). En el presente estudio se identificó expresión a la alta de *CRH* en los casos de suicidio en comparación a controles, lo que sugiere que *CRH* podría estar desencadenando la producción de MIF en el cerebro, dado que MIF se expresa en células inmunitarias y nuestros hallazgos indican una expresión alterada de *CD22* y *NFATC4*, genes implicados en la regulación de las células B y T, podemos deducir que existe un aumento la activación inmunitaria adaptativa e innata y que podría estar comandada a través de regulación epigenética y por la presencia de estímulos de estrés crónico. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos del genoma completo, donde se implicaron genes asociados a vías del sistema inmunitarios en la misma región cerebral de casos de suicidio (Murphy et al., 2017; Kouter, 2019; Pantazatos et al., 2016 ; Policicchio et al., 2020).

El estrés crónico también provocar inflamación a través de la citoquina proinflamatoria tipo 2 segregada por células inmunitarias (Dhabhar, 2009). En el presente estudio encontramos evidencia de la presencia de respuesta inflamatoria

en los casos de suicidio. Por ejemplo, se identificó un aumento en la metilación y regulación a la baja de *NLRP3*, gen regulador de la respuesta inflamatoria (Swanson, Deng, y Ting, 2019). Un estudio en células mononucleares de sangre periférica, mostró que el transcrito de *NLRP3* se encontraba hipoexpresado en pacientes con trastorno bipolar (Scaini et al., 2019); sin embargo, la metilación del DNA en este locus no se ha implicado previamente en el suicidio.

Interesantemente, se ha sugerido que MIF controla la expresión del inflamasoma *NLRP3* y que este juega un papel central para limitar la velocidad de producción de citocinas activas (Shin et al. 2019; Lang et al., 2018), por lo que sugerimos que la expresión a la baja de *NLRP3* puede provocar pérdida en la capacidad del sistema para mantener una respuesta inflamatoria adecuada en la corteza prefrontal de casos de suicidio.

Se identificó alteraciones epigenéticas en el gen *CD22* (receptor de células B *CD22*) es un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina que participan en la regulación de la expresión de la inmunoglobulina M de superficie en las células B. Específicamente, se identificó que su promotor estaba hipermetilado y se asoció con una expresión disminuida de su transcrito, lo que indica que el estado de metilación de este DMR tiene el potencial de modificar la actividad de su promotor. Si bien *CD22* no había sido previamente asociado al fenotipo suicida, en estudios previos de análisis del genoma completo, se identificó que las expresiones del gen *CD44*, *CD300LB*, una glucoproteína análoga de la superficie celular del antígeno, son más bajas en la BA9 de casos de suicidio (Thalmeier et al., 2008; Sequeira et al., 2007; Galfalvy et al., 2013).

Otro hallazgo relevante fue que detectamos genes relacionados al proceso neurofisiológico regulado por la hormona liberadora de corticotropina asociados a suicidio. Si bien, las alteraciones en la expresión de *CRH* es uno de los resultados más consistente en el contexto del suicidio (Zhao et al., 2015; Humphreys et al., 2019a; Jokinen et al., 2018; Humphreys et al., 2019b; Roy, Shelton, y Dwivedi 2017; Claes, 2004), el mecanismo de su regulación no está del todo esclarecido. Aquí observamos una hipermetilación en la región promotora de *CRH* asociada con expresión a la alta de su transcrito en la corteza prefrontal del grupo de casos. La metilación en las islas CpG de las zonas promotores generalmente se asocia con la represión de la actividad genética (Delcuve, Rastegar, y Davie 2009; Novakovic et al., 2011). Sin embargo, una relación no típica de hipermetilación en la zona promotora y expresión a la alta del transcrito se ha descrito en genes con promotores constituidos por escasos sitios CpGs y la región promotora del *CRH* aquí identificado cae dentro de los criterios establecidos para clasificarlo como promotor con baja densidad de CpGs (Weber et al., 2007).

Por otra parte, los resultados de vías de señalización sugieren que adenilato ciclasa a través de *ADCY9* podría estar participando en el proceso neurofisiológico regulación de *CRH*. Estudios moleculares han identificado una secuencia sensible a AMP (CRE) cíclico localizado a 200 bp río arriba del principal sitio de inicio de transcripción (Adler et al., 1990). Estudios previos, ha demostrado que la metilación en sitios de CRE en *CRH* pueden aumentar la afinidad de las proteínas de unión con los factores de transcripción y provocar un incremento en su expresión (Pan et al., 2015; Rishi et al., 2010). Además, el receptor de *CRH* pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G y envía señales al

interior de la célula a través del mecanismo dependiente de cAMP (Baritaki et al., 2019). Lo que nos haría suponer que existe una retroalimentación positiva entre *CRH* y *ADCY9* en la corteza prefrontal de los casos de suicidio, aunque faltarían estudios funcionales para corroborar esta hipótesis.

Por otra parte, los procesos de regulación sináptica fueron de nuestro especial interés, ya que fue la vía más enriquecida. La plasticidad sináptica es una de las funciones más fundamentales e importantes del cerebro. La eficacia de la transmisión en una sinapsis depende de la modulación de la conectividad entre las neuronas y los circuitos neuronales durante la adaptación al entorno (Marsden et al., 2013). Estudios anteriores han destacado como rol clave la plasticidad sináptica en el suicidio (Liu et al., 2017). Por ejemplo, Nagy et al., (2020) identificaron genes diferencialmente expresados de estirpe celular específico asociados a la regulación de la plasticidad sináptica en la corteza prefrontal dorsolateral de casos de suicidio. Nuestros hallazgos muestran que *ADCY9* y *CRH* eran miembros de la vía de plasticidad sináptica y que se encuentran desregulados en los casos de suicidio. Numerosa evidencia indica que adenilato ciclasa es un regulador esencial de la plasticidad sináptica. Por ejemplo, regula las vías relacionadas con la potenciación a largo plazo, como la señalización de adenilato ciclasa sensible a  $Ca^{2+}$  / calmodulina (Wang y Storm, 2003; Abel y Nguyen, 2008), la señalización de cAMP-PKA (Wang and Storm, 2003; Banko et al., 2004) y la actividad de la proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB) (Benito et al., 2011). Además, la desregulación de *ADCY9* y CREB se ha observado previamente en la corteza prefrontal de individuos que murieron por suicidio (Yamada et al., 2003; Pandey et al., 2007). Curiosamente, la vía de

transducción de señales a través de CREM también se enriqueció en los casos de suicidio. En conjunto, la regulación a la baja de *ADCY9* puede alterar la señalización de CREB y por lo tanto, afectar la regulación de la plasticidad sináptica en la corteza prefrontal de las personas que murieron por suicidio. Dado que los estudios funcionales de la adenilato ciclasa en el contexto del suicidio son escasos, son necesarias futuras investigaciones para explicar la función de *ADCY9* y su papel en la plasticidad sináptica.

### **8. Limitaciones y direcciones para investigaciones futuras**

El presente estudio representa un paso importante para identificar los cambios epigenéticos de la corteza prefrontal asociados a casos de suicidio en mexicanos. Sin embargo, los resultados deben interpretarse con cautela, ya que existen limitaciones en el este estudio. Para empezar, el tamaño de muestra es relativamente pequeña, sin embargo, se caracterizó cada muestra con datos adicionales como información demográfica y datos clínicos detallados. Esta información fue considerada en nuestros análisis estadísticos. En segundo lugar, una limitación inherente a los análisis con microarreglos es la incapacidad de estos para distinguir las citosinas metiladas de las citosinas hidroximetiladas, por lo que es razonable considerar que las diferencias detectadas se vean confundidas por otras modificaciones. Otro punto importante a considerar en este estudio es que la solidez de nuestros hallazgos está limitada por varios factores. Primero, debido a la falta de replicación nuestros resultados en conjuntos de datos independientes. Segundo, en nuestro estudio no se evaluaron datos explicativos



adicionales como el genotipo. Los enfoques integradores han demostrado que la metilación del ADN se predice mejor en la combinación de información del genotipo con factores ambientales (Czamara et al., 2019). Otra limitación relevante de este estudio es la falta de validación técnica en otras regiones de genes candidatos principales identificadas como enriquecidas en nuestro análisis de vías; sin embargo, hemos demostrado que nuestros hallazgos se ajustan a las vías biológicas previamente reportadas, como la plasticidad sináptica, que a su vez respalda la confiabilidad de nuestros resultados. Aun así, se necesitan estudios futuros para replicar nuestros hallazgos en cohortes más grandes independientes. Sin embargo, este estudio representa el primero en investigar una población mexicana en el contexto del suicidio. Sería valioso que futuras investigaciones realicen análisis de seguimiento de los resultados de esta tesis.

## 9. Conclusiones

1.- Este es el primer análisis de metilación en todo el genoma que integra datos de expresión en muestras cerebrales asociadas a suicidio en población Mexicana.

2.- Mediante análisis bioinformáticos y una validación técnica, se identificaron genes y vías de señalización de gran relevancia el funcionamiento de la corteza prefrontal, los cuales resaltan a *ADCY9* como una molécula que podría ser de importancia en la fisiopatología del suicidio.

3.- Las herramientas de alto rendimiento para la detección del genoma completo, proporcionan mayor información transcripcional y epigenética, la cual puede ser útil para identificar genes candidatos implicados en la etiología del suicidio y para que a largo plazo, esta información puede ser utilizada para desarrollar herramientas de detección en sujetos que estén en riesgo.

## Referencias

- Abel T, Nguyen PV (2008) Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Prog Brain Res* 169:97–115.
- Adler GK, Smas CM, Fiandaca M, et al (1990) Regulated Expression of the Human Corticotropin Releasing Hormone Gene by Cyclic AMP. *Molecular and Cellular Endocrinology* 70 (2): 165–74.
- Amen D, Prunella JR, Fallon JH, et al. (2009) A comparative analysis of completed suicide using high resolution brain SPECT imaging. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 21(4): 430–9.
- Anacker C, O'Donnell KJ, Meaney MJ (2014) Early Life Adversity and the Epigenetic Programming of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 16 (3): 321–33.
- Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, Xie B, Daley GQ, Church GM (2009) Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol* 27:361–368.
- Banko JL, Hou L, Klann E (2004) NMDA receptor activation results in PKA- and ERK-dependent Mnk1 activation and increased eIF4E phosphorylation in hippocampal area CA1. *J Neurochem* 91:462–470.
- Baritaki S, Chatzaki E, Pothoulakis C (2019) Chronic Stress, Inflammation, and Colon Cancer: A CRH System-Driven Molecular Crosstalk. *Journal of Clinical Medicine* 8:1669.
- Benito E, Valor LM, Jimenez-Minchan M, Huber W, Barco A (2011) cAMP response element-binding protein is a primary hub of activity-driven neuronal gene expression. *J Neurosci* 31:18237–18250.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30 (15): 2114–20.
- Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, et al. (1995) MIF as a Glucocorticoid-Induced Modulator of Cytokine Production. *Nature* 377 (6544): 68–71.
- Calandra T, Roger T (2003) Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Regulator of Innate Immunity. *Nature Reviews Immunology*. European Association for Cardio-Thoracic Surgery.
- Chen GG, Gross JA, Lutz PE, et al. (2017) Medium Throughput Bisulfite Sequencing for Accurate Detection of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine. *BMC Genomics* 18 (1): 96.
- Cheung S, Woo J, Maes MS, Zai CC (2020) Suicide Epigenetics, a Review of Recent Progress 265:423:438.
- Claes SJ (2004) Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) in Psychiatry: From Stress to Psychopathology. *Annals of Medicine*.
- Cowburn RF, Marcusson JO, Eriksson A, et al. (1994) Adenylyl Cyclase Activity and G-Protein Subunit Levels in Postmortem Frontal Cortex of Suicide Victims. *Brain Research* 633 (1–2): 297–304.
- Cruceanu C, Kutsarova E, Chen ES, et al. (2016) DNA Hypomethylation of Synapsin II CpG Islands Associates with Increased Gene Expression in Bipolar Disorder and Major Depression. *BMC Psychiatry* 16 (1).
- Czamara D, et al.; Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric

- Genomics Consortium (2019) Integrated analysis of environmental and genetic influences on cord blood DNA methylation in new-borns. *Nat Commun* 10:2548
- Dalman MR, Deeter A, Nimishakavi G, et al. (2012) Fold Change and P-Value Cutoffs Significantly Alter Microarray Interpretations. *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 2 (S2): S11.
- Dalton VS, Kolshus E, McLoughlin DM (2014) Epigenetics and Depression: Return of the Repressed. *Journal of Affective Disorders. J Affect Disord.*
- Deaton AM, Bird A (2011) CpG Islands and the Regulation of Transcription. *Genes and Development* 25 (10).
- Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR (2009) Epigenetic Control. *Journal of Cellular Physiology. J Cell Physiol.*
- Desmyter S, Van Heringen C, Audenaert K (2011). Structural and functional neuroimaging studies of the suicidal brain. *Progress in Neuro-psych and Biol Psych* 35: 798-808.
- Dhabhar FS (2009) Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology. *NeuroImmunoModulation. Neuroimmunomodulation.*
- Du P, Zhang X, Huang CC, et al. (2010) Comparison of Bvalue and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics* 11(1):587.
- Ernst C. et al. (2009) Suicide neurobiology. *Prog. Neurobiol.* 89, 315–333.
- Ernst C, Chen ES, Turecki G. (2009b). Histone methylation and decreased expression of TrkB. T1 in orbital frontal cortex of suicide completers. *Mol. Psychiatry* 9, 830–832.
- Fan H, Kao W, Yang YH, Harris RGJ, Fingerle-Rowson G, et al., (2014) Macrophage Migration Inhibitory Factor Inhibits the Antiinflammatory Effects of Glucocorticoids via Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper. *Arthritis and Rheumatology* 66 (8): 2059–70.
- Felsenfeld G (2014) A Brief History of Epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (1).
- Fiori LM, Turecki G (2010) Gene expression profiling of suicide completers. *Eur Psychiatry* 25:287–290.
- Gao SF, Bao AM (2011) Corticotropin-releasing hormone, glutamate, and  $\gamma$ -aminobutyric acid in depression. *Neuroscientist*;17(1):124-44.
- Galfalvy H, Zalsman G, Huang YY, et al. (2013) A Pilot Genome Wide Association and Gene Expression Array Study of Suicide with and without Major Depression. *World Journal of Biological Psychiatry* 14 (8): 574–82.
- Goes FS, McGrath J, Avramopoulos D, et al. (2015) Genome-wide association study of schizophrenia in Ashkenazi Jews. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*;168(8):649-59.
- Gross JA, Turecki G (2013) Suicide and the polyamine system *CNS Neurol Disord Drug Targets*; 12: 980–988.
- Guintivano J, Brown T, Newcomer A, Jones, et al. (2014) Identification and replication of a combined epigenetic and genetic biomarker predicting suicide and suicidal behaviors. *Am. J. Psychiatry* 171, 1287–1296.

- Guintivano J, Aryee MJ, Kaminsky ZA (2013) A Cell Epigenotype Specific Model for the Correction of Brain Cellular Heterogeneity Bias and Its Application to Age, Brain Region and Major Depression. *Epigenetics*.
- Hachiya T, Furukawa R, Shiwa Y, et al. (2017). Genome-Wide Identification of Inter-Individually Variable DNA Methylation Sites Improves the Efficacy of Epigenetic Association Studies. *Npj Genomic Medicine* 2 (1): 11.
- Haghighi F, Xin Y, Chanrion B, et al. (2014) Increased DNA Methylation in the suicide brain. *Dialogues Clin Neurosci* 16: 430-438.
- Haines D (2000) *Neuroanatomy: An Atlas of Structures, Sections, and Systems*. 5th ed. Philadelphia, PA Lippincott Williams & Wilkins.
- Herman JP, Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*; 20(2):78-84.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, et al. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24(3):151-80.
- Humphreys KL, Moore SR, Davis EG, et al. (2019a) DNA Methylation of HPA-Axis Genes and the Onset of Major Depressive Disorder in Adolescent Girls: A Prospective Analysis. *Translational Psychiatry* 9 (1).
- Humphreys KL (2019b) DNA Methylation of HPA-Axis Genes and the Onset of Major Depressive Disorder in Adolescent Girls: A Prospective Analysis. *Translational Psychiatry* 9 (1): 1–10.
- Iemmi V, Bantjes J, Coast E, et al. (2016) Suicide and Poverty in Low-Income and Middle-Income Countries: A Systematic Review. *The Lancet Psychiatry*. Elsevier Ltd.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadísticas de Mortalidad. (2017). Disponible en: [http://www.beta.inegi.org.mx/app/tabulados/pxweb/inicio.html?rxid=75ada3fe-1e52-41b3-bf27-4cda26e957a7&db=mortalidad&px=mortalidad\\_7](http://www.beta.inegi.org.mx/app/tabulados/pxweb/inicio.html?rxid=75ada3fe-1e52-41b3-bf27-4cda26e957a7&db=mortalidad&px=mortalidad_7).
- INSP. National Health and Nutrition Survey 2012. Poblacion joven y violencia interpersonal: reduccion de la vulnerabilidad y opciones de futuro. [https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/documentos\\_analiticos.php](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/documentos_analiticos.php).
- INSP. National Health and Nutrition Survey 2012. Distribucion de la inseguridad alimentaria: evidencia para intervenciones diferenciadas. [https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/documentos\\_analiticos.php](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/documentos_analiticos.php).
- INSP. National Health and Nutrition Survey 2012. Indicadores de bienestar infantil en Mexico: una agenda politica para el monitoreo y la accion. [https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/documentos\\_analiticos.php](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/documentos_analiticos.php).
- INSP. National Health and Nutrition Survey 2012. Cobertura efectiva en salud: reforzar prevencion y reducir la brecha socioeconomica. [https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/documentos\\_analiticos.php](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/documentos_analiticos.php).
- Jokinen J, Boström AE, Dadfar A, et al. (2018) Epigenetic Changes in the CRH Gene Are Related to Severity of Suicide Attempt and a General Psychiatric Risk Score in Adolescents. *EBioMedicine* 27: 123–33.
- Jollant F, Lawrence NL, Olié E, et al. (2011) The suicidal mind and brain: a review of neuropsychological and neuroimaging studies. *World J Biol Psychiatry* 12:319–339.

- Jollant F, Bellivier F, Leboyer M, et al., (2005) Impaired decision making in suicide attempters. *Am. J. Psychiatry* 162, 304–310.
- Jollant F, Lawrence NS, Olie E, et al. (2010) Decreased activation of lateral orbitofrontal cortex during risky choices under uncertainty is associated with disadvantageous decision-making and suicidal behavior. *NeuroImage* 51, 1275–1281.
- Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13: 484-492.
- Kang HJ, Voleti B, Hajszan T, et al. (2012) Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat Med* 18: 1413–1417.
- Kang HJ, Adams DH, Simen A, et al. (2007) Gene expression profiling in postmortem prefrontal cortex of major depressive disorder. *J Neurosci* 27: 13329–13340.
- Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, et al. (2010) Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. *Arch. Gen. Psychiatry* 67, 258–267.
- Kim C, Seguin M, Therrien N, et al. (2005) Familial Aggregation of Suicidal Behavior: A family Study of Male Suicide Completers from General Population. *Am J Psychiatry* 162: 1017-1019.
- Kouter K, Zupanc T, Videtič PA (2019) Genome-Wide DNA Methylation Patterns in Suicide Victims: Identification of New Candidate Genes. 31, 392-396.
- Kozlenkov A, Jaffe AE, Timashpolsky A, et al. (2017) DNA Methylation Profiling of Human Prefrontal Cortex Neurons in Heroin Users Shows Significant Difference between Genomic Contexts of Hyper- and Hypomethylation and a Younger Epigenetic Age. *Genes* 8 (6): 2–15.
- Kyriakis JM, Avruch J (2012) Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev* 92(2):689-737.
- Labonté B, Suderman M, Maussion G, et al., (2013) Genome-Wide Methylation Changes in the Brains of Suicide Completers. *American Journal of Psychiatry* 170 (5): 511–20.
- Lang T, Lee JPW, Elgass K, et al. (2018) Macrophage Migration Inhibitory Factor is Required for NLRP3 Inflammasome Activation. *Nature Communications* 9 (1): 1–15.
- Liu W, Ge T, Leng Y, Pan Z, Fan J, Yang W, Cui R (2017) The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex. *Neural Plast* 2017:6871089.
- Lutz PE, Gross JA, Dhir SK, Maussion G, Yang J, Bramouille A, Meaney MJ, Turecki G (2018) Epigenetic regulation of the kappa opioid receptor by child abuse. *Biol Psychiatry* 84:751– 761.
- Maussion G, Yang J, Suderman M, et al. (2014) Functional DNA methylation in a transcript specific 3'UTR region of TrkB associates with suicide. *Epigenetics* 9, 1061–1070.
- Marsden WN (2013) Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 43:168–184.

- Mesulam M (2000) Principles of Behavioral and Cognitive Neurology. Oxford University Press.
- Morris TJ, LM Butcher, A Feber, et al. (2014) ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. *Bioinformatics* 30, 428-30.
- Mullins N, Bigdeli TB, Børghlum AD, et al. (2019) GWAS of Suicide Attempt in Psychiatric Disorders and Association with Major Depression Polygenic Risk Scores. *American Journal of Psychiatry* 176 (8): 651–60.
- Mundo-Rosas V, Vizuet-Vega NI, Martínez-Domínguez J, et al. (2018) Evolution of food insecurity in Mexican households: 2012-2016. *Salud Publica Mex* 60:309-318.
- Murphy ET, Crawford B, Dempster EL, et al. (2017) Methylomic profiling of cortex samples from completed suicide cases implicates a role for PSORS1C3 in major depression and suicide. *Transl Psychiatry*. 7.
- Nagy C, Suderman M, Yang J, et al. (2015) Astrocytic abnormalities and global DNA methylation patterns in depression and suicide. *Mol Psychiatry* 20: 320–328.
- Nagy C, Vaillancourt K, Turecki G (2018) A Role for Activity-Dependent Epigenetics in the Development and Treatment of Major Depressive Disorder. *Genes, Brain and Behavior*. Blackwell Publishing Ltd.
- Nagy C, Maitra M, Tanti A, et al. (2020) Single-nucleus transcriptomics of the prefrontal cortex in major depressive disorder implicates oligodendrocyte precursor cells and excitatory neurons. *Nat Neurosci* 23:771–781.
- Nolte J (2002) The Human Brain: An Introduction to Its Functional Neuroanatomy. 5th ed. St Louis, MO Mosby–Year Book Inc.
- Novakovic B, Gordon L, Wong NC, et al. (2011) Wide-Ranging DNA Methylation Differences of Primary Trophoblast Cell Populations and Derived Cell Lines: Implications and Opportunities for Understanding Trophoblast Function. *Molecular Human Reproduction* 17 (6): 344–53.
- Oquendo, MA (2015) Impulsive versus Planned Suicide Attempts: Different Phenotypes? *Journal of Clinical Psychiatry*. Physicians Postgraduate Press Inc.
- Organización mundial de la salud (2014) Preventing suicide: a global imperative Preventing suicide: a global imperative.: Geneva, disponible en: [http://www.who.int/mental\\_health/suicide-prevention/world\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/mental_health/suicide-prevention/world_report_2014/en/).
- Oyesanya, Mayowa, Lopez-Morinigo J, Dutta R (2015) Systematic Review of Suicide in Economic Recession *World Journal of Psychiatry* 5 (2): 243.
- Pan X, Bowman M, Scott RJ, et. al (2015) Methylation of the Corticotropin Releasing Hormone Gene Promoter in BeWo Cells: Relationship to Gene Activity. *International Journal of Endocrinology*.
- Pandey GN, Rizavi HS, Bhaumik R, Ren X (2019) Increased protein and mRNA expression of corticotropin-releasing factor (CRF), decreased CRF receptors and CRF binding protein in specific postmortem brain areas of teenage suicide subjects. *Psychoneuroendocrinology*. 106:233–243.
- Pandey GN, Dwivedi Y, Ren X, Rizavi HS, Roberts RC, Conley RR (2007) Cyclic AMP response element-binding protein in post-mortem brain of teenage suicide victims: specific decrease in the prefrontal cortex but not the hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol* 10:621–629.

- Pantazatos SP, Huang YY, Rosoklija GB, et al. (2016) Whole-Transcriptome Brain Expression and Exon-Usage Profiling in Major Depression and Suicide: Evidence for Altered Glial, Endothelial and ATPase Activity. *Nature Publishing Group* 22: 760–73.
- Peschansky VJ, Wahlestedt C (2014) Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*. 9(1):3-12.
- Petrides M (2005) Lateral prefrontal cortex: architectonic and functional organization. 360, 781-795.
- Piacentini M (2014) Measuring Income Inequality and Poverty at the Regional Level in OECD Countries OECD Statistics Working Papers.
- Policicchio S, Washer S, Viana J, et al. (2020) Genome-Wide DNA Methylation Meta-Analysis in the Brains of Suicide Completers. *Translational Psychiatry* 10 (1).
- Poulter MO, Du L, Weaver IC, et al. (2008) GABAA receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes. *Biol. Psychiatry* 64, 645–652.
- Punzi G, Ursini G, Shin JH (2014) Increased expression of MARCKS in post-mortem brain of violent suicide completers is related to transcription of a long, noncoding, antisense RNA. *Mol Psychiatry*. 19: 1057–1059.
- Reiach JS, Li PP, Warsh JJ, et al. (1999) Reduced Adenylyl Cyclase Immunolabeling and Activity in Postmortem Temporal Cortex of Depressed Suicide Victims. *Journal of Affective Disorders* 56.
- Rishi V, Bhattacharya P, Chatterjee R, et. al (2010) CpG Methylation of Half-CRE Sequences Creates C/EBP $\alpha$  Binding Sites That Activate Some Tissue-Specific Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (47): 20311–16.
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43, 47.
- Romero-Pimentel AL, Mendoza-Morales RC, Fresan A, et. al (2018) Demographic and Clinical Characteristics of Completed Suicides in Mexico City 2014-2015. *Frontiers in Psychiatry* 9 Frontiers Media SA.
- Roy B, Shelton RC, Dwivedi Y (2017) DNA Methylation and Expression of Stress Related Genes in PBMC of MDD Patients with and without Serious Suicidal Ideation. *Journal of Psychiatric Research* 89: 115–24.
- Scaini G, Barichello T, Fries GR, et al. (2019) TSPO Upregulation in Bipolar Disorder and Concomitant Downregulation of Mitophagic Proteins and NLRP3 Inflammasome Activation. *Neuropsychopharmacology* 44 (7): 1291–99.
- Schneider E, Hajj N, Muller F., et al., (2015) Epigenetic Dysregulation In The Prefrontal Cortex Of Suicide Completers. *Cytogenetic And Genoma Research*. 146:19-27.
- Schosser A, Butler AW, Ising M, et al. (2011) Genomewide Association Scan of Suicidal Thoughts and Behaviour in Major Depression. *PLoS ONE* 6 (7).
- Sequeira AT, Klempan L, Canetti J, et al. (2007) Patterns of Gene Expression in the Limbic System of Suicides with and without Major Depression. *Molecular Psychiatry* 12 (7): 640–55.
- Shin MS, Kang Y, Wahl ER, et al. (2019) Macrophage Migration Inhibitory Factor



- Regulates U1 Small Nuclear RNP Immune Complex–Mediated Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Arthritis and Rheumatology* 71 (1): 109–20.
- Sokolowski M, Wasserman J, Wasserman D (2015) An overview of the neurobiology of suicidal behaviors as one meta-system. *Nature* 20: 56-71.
- Sun H, Kennedy PJ, Nestler EJ (2013) Epigenetics of the Depressed Brain: Role of Histone Acetylation and Methylation. *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group.
- Swanson KV, Deng M, Ting JPY (2019) The NLRP3 Inflammasome: Molecular Activation and Regulation to Therapeutics. *Nature Reviews Immunology*. Nature.
- Thalmeier A, Dickmann M, Giegling I, et al. (2008) Gene Expression Profiling of Post-Mortem Orbitofrontal Cortex in Violent Suicide Victims. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 11 (2): 217–28.
- Timp W, Bravo HC, McDonald OG, et al. (2014) Large Hypomethylated Blocks as a Universal Defining Epigenetic Alteration in Human Solid Tumors. *Genome Medicine* 6 (8): 61.
- Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, et al. (2008) Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. *Neurosci Res* 60:184–191.
- Turecki G (2014) The molecular bases of the suicidal brain. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 802–816 Springer Nature.
- Vermeesch JR, Voet T, Devriendt K (2016) Prenatal and Pre-Implantation Genetic Diagnosis. *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group.
- Vijayakumar L, John S, Pirkis J, Whiteford H (2005) Suicide in Developing Countries (2): Risk Factors. *Crisis*. Crisis.
- Yamada S, Yamamoto M, Ozawa H, Riederer P, Saito T (2003) Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Neural Transm* 110:671–680.
- Wagner G, Schultz C, Koch K, et al. (2012) Prefrontal cortical thickness in depressed patients with high-risk for suicidal behavior. *J. Psych Research* 46: 1449-1455.
- Wang H, Storm DR (2003) Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *Mol Pharmacol* 63:463–468.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. (2007) Distribution, Silencing Potential and Evolutionary Impact of Promoter DNA Methylation in the Human Genome. *Nature Genetics* 39 (4): 457–66.
- Willour VL, Seifuddin F, Mahon PB, et al. (2012) A Genome-Wide Association Study of Attempted Suicide. *Molecular Psychiatry* 17 (4): 433–44.
- Wray, Naomi R, Gottesman I (2012) Using Summary Data from the Danish National Registers to Estimate Heritabilities for Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Major Depressive Disorder. *Frontiers in Genetics* 3.
- Zhao J, Qi XR, Gao SF, et al. (2015) Different Stress-Related Gene Expression in Depression and Suicide.