

POLIMORFISMOS SEROTONINÉRGICOS: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN LA POBLACIÓN DE MAR DEL PLATA, ARGENTINA Y COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE GENOTIPADO

SEROTONERGIC POLYMORPHISMS: ALLELIC AND GENOTYPIC FREQUENCY DISTRIBUTION IN THE MAR DEL PLATA, ARGENTINA, POPULATION AND COMPARISON OF GENOTYPING METHODS

Perez Maturo J.^{1*}, Videla Y.¹, Di Gerónimo V.², Quintana S.^{2,3}

¹ Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Funes 3350, 7600, Mar del Plata, Argentina.

² Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Análisis Fares Taie, Rivadavia 3331, 7600, Mar del Plata, Buenos Aires.

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Rivadavia 1917, C1033AAJ, Buenos Aires, Argentina.

* corresponding author: josefinap.m@hotmail.com

ABSTRACT

There are variable responses to Serotonin Selective Reuptake Inhibitors (SSRIs) among patients treated with this medication. Polymorphisms found in the genes coding for the serotonin transporter (5-HTT) and the serotonin 2A receptor (5-HTR2A) can be used as genetic biomarkers capable of predicting treatment efficacy. The *SLC6A4* gene has two polymorphisms: 5-HTTLPR, consisting of an insertion/deletion of 44 bp, and 5-HTTVNTR, characterized by 9, 10 or 12 copies of a region of 16–17 bp. Gene *5-HTR2A* presents the 1438 G/A SNP. In order to obtain the allelic and genotypic frequencies of the listed polymorphisms in a sample of the Mar del Plata city population, Argentina; PCR and PCR-RFLP methodologies were applied to genotype the 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms and the 1438 G/A SNP in 384 unrelated individuals. Different primers for genotyping were compared. The allelic and genotypic frequencies obtained for polymorphism were the following: 5-HTTLPR polymorphism L/L: 18 %; L/S: 61 %; S/S: 21 % (Freq allelic L: 49 %; S: 51 %) and the 5-HTTVNTR 12/12: 42 %, 12/10: 41 %; 10/10: 17 % (Freq Allelic 10: 37.5 %; 12: 62.5 %). For polymorphism 1438 G/A GA: 47 % GG: 36 %, AA: 17 % (Freq allelic G: 59.5 %; A: 40.5 %). This study will provide useful data for investigations that require the use of these polymorphisms as genetic markers linked to the response to psychoactive drugs in our population.

Key words: serotonergic polymorphisms, population frequencies for depression, pharmacogenetics

RESUMEN

La respuesta a los ISRS (Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina) entre los pacientes bajo tratamiento con esta medicación es variable. Los polimorfismos hallados en los genes que codifican para el transportador de serotonina (5-HTT) y para el receptor de serotonina 2A (5-HTR2A) pueden utilizarse como biomarcadores genéticos capaces de predecir la respuesta al fármaco. El gen *SLC6A4* presenta dos polimorfismos: 5-HTTLPR, que consiste en una inserción/delección de 44 pb, y 5-HTTVNTR caracterizado por 9, 10 o 12 copias de una región de 16–17 pb. El gen *5-HTR2A* presenta el marcador SNP 1438 G/A. Con el objetivo de calcular las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos mencionados en una muestra de la población marplatense se pusieron a punto metodologías de PCR y PCR-RFLP que permitieron genotipificar los polimorfismos 5-HTTLPR, 5-HTTVNTR y el marcador SNP 1438 G/A en 384 individuos no relacionados de la población marplatense. Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas fueron las siguientes: para el polimorfismo 5-HTTLPR L/L: 18 %; L/S: 61 %; S/S: 21 % (Frec. alélica L: 49 %; S: 51 %) y para el polimorfismo 5-HTTVNTR 12/12: 42 %, 12/10: 41 %; 10/10: 17 % (Frec. Alélica 10: 37,5 %; 12: 62,5 %). Para el polimorfismo SNP 1438 G/A GA: 47 %, GG: 36 %, AA: 17 % (Frec. alélica G: 59,5 %; A: 40,5 %). Este estudio aportará datos de utilidad para investigaciones que requieran el uso de estos polimorfismos como marcadores genéticos vinculados a la respuesta a psicofármacos en nuestra población.

Palabras clave: polimorfismos serotoninérgicos, frecuencias poblaciones para depresión, farmacogenética

INTRODUCCIÓN

Los Inhibidores Selectivos de Recaptura de Serotonina (ISRS) son actualmente los fármacos más utilizados para tratar estados depresivos y otras patologías psiquiátricas como ansiedad, desórdenes de personalidad, esquizofrenia, trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), ya que generan menos efectos secundarios en relación a los antidepresivos tricíclicos y a los IMAO. Actúan bloqueando la recaptura o limpieza de la serotonina (5-HT) por parte del transportador de serotonina (5-HTT), lo que incrementa el nivel del neurotransmisor en la hendidura sináptica (Rakel, 2009; Artiga, 1997).

A pesar de que los ISRS son más tolerables y seguros que otros antidepresivos, existe una respuesta variable a la medicación entre los pacientes bajo tratamiento. Se han detectado casos de síndrome serotoninérgico, síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética, arritmias cardíacas, hipotensión, convulsiones, depresión del SNC, empeoramiento de la depresión y efectos adversos a nivel gastrointestinal (Looper, 2007).

Si bien se han tratado de identificar predictores de respuesta farmacológica en base a variables fenotípicas, no se han logrado tener mediciones de estas variables que se correlacionen de forma constante con la respuesta al tratamiento. Los abordajes genéticos-moleculares proveen un método novedoso capaz de predecir la respuesta al fármaco. Esta nueva herramienta constituye la base de la farmacogenética o medicina personalizada (Bogad, 2008).

La variabilidad genética presente en la población humana, como así también el grado de estructuración que puede existir, genera que las frecuencias alélicas difieran entre las poblaciones o grupos étnicos (Daar y Singer, 2005; Nelson *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2014). Por lo cual, en las fases de desarrollo, las investigaciones en el área de la farmacogenética se focalizan en obtener resultados poblacionales (Bogad, 2008). Conocer qué alelos y con qué frecuencia están presentes en la población de interés es siempre el primer paso para la aplicación de la farmacogenética (Daar y Singer, 2005; Nelson *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2014).

Dado que el efecto de los ISRS radica en bloquear al transportador de serotonina, aumentando en consecuencia la serotonina sináptica que interactúa con receptores de serotonina pre y post-sinápticos, tanto estos receptores como el transportador pueden contribuir a los efectos serotoninérgicos adversos, por lo cual, los polimorfismos

hallados en los genes que los codifican pueden utilizarse como biomarcadores genéticos capaces de predecir la respuesta al tratamiento (Keers y Aitchison, 2011; Kohen *et al.*, 2008). De particular interés es el estudio de dos polimorfismos detectados en el gen que codifica para el transportador de serotonina (5-HTT) (Keers y Aitchison, 2011; Kohen *et al.*, 2008; Malhotra *et al.*, 2004) y uno en el que codifica para el receptor de serotonina 2A (5-HTR2A) (Keers y Aitchison, 2011; Malhotra *et al.*, 2004).

EL 5-HTT es codificado por el gen *SLC6A4*, localizado en el brazo largo del cromosoma 17 en la región q11.2, consta de 40 Kb y se compone de catorce exones (Smits *et al.*, 2004). Este gen presenta dos polimorfismos: 5-HTTPR, que consiste en una inserción/delección de 44 pb en la región promotora y genera dos variantes alélicas, una de brazo corto (S) y una de brazo largo (L) (Gonda *et al.*, 2006; Caspi *et al.*, 2003) y 5-HTTVNTR caracterizado por 9, 10 o 12 copias de una región de 16-17 bp en el intrón 2 (Smits *et al.*, 2004); las variantes cortas se asocian a una menor transcripción del gen y a una menor concentración y funcionalidad de la proteína (Smits *et al.*, 2004; Caspi *et al.*, 2003; Hranilovic *et al.*, 2004; Drtilkova *et al.*, 2010).

El gen que codifica para el receptor 2A de serotonina, *5-HTR2A*, se localiza en el cromosoma 13q14-q21. Está conformado por tres exones y abarca 20 kb. Uno de los polimorfismos más estudiados en relación a la eficacia del tratamiento con antidepresivos del tipo ISRS es el SNP (polimorfismo de nucleótido simple) G/A en la posición 1438 [rs6311] de la región promotora (Martinez-Barrondo *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008). Existen estudios que asocian la variante alélica G con una disminución de la expresión del receptor, y a la vez, los portadores del alelo G suelen ser los que presentan mayores efectos adversos a estos fármacos (Kim *et al.*, 2008; Stevenson y Bishop, 2013). Como referencia de lo que sucede en Argentina, una investigación reciente llevada a cabo en la ciudad de Rosario determinó la distribución alélica y genotípica del 5-HTTLPR en la población local, obteniendo una frecuencia para el genotipo LL del 29%, para el genotipo SS del 23% y para el genotipo SL del 48% y por ende una frecuencia del alelo S mayor (53%) que del alelo L (47%) (Ostera *et al.*, 2014). Cabe destacar que es la única publicación encontrada hasta el momento que evalúa la frecuencia génica de este polimorfismo en el país.

Dada la importancia de estudios de determinación de frecuencias alélicas y genotípicas en investigaciones de

farmacogenética, y dada la escasez de estudios que evalúan la distribución poblacional de estos polimorfismos a nivel nacional, se plantea validar metodologías de Biología Molecular que permitan estudiar los polimorfismos 5-HTTLPR y 5-HTTVNTR del transportador de serotonina y el SNP 1438 A/G del receptor 2A de serotonina para su aplicación en el estudio de frecuencias alélicas y genotípicas en una muestra de la población marplatense.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de pacientes

Se extrajo sangre periférica de 384 pacientes ambulatorios. La sangre fue extraída por punción venosa (antebrazo) y recolectada en un tubo de plástico estéril con anticoagulante EDTA. Las muestras fueron elegidas aleatoriamente de un conjunto de muestras del Laboratorio de Análisis Fares Taie, utilizadas para estudios genéticos desde 2013 a 2015. La población estudiada tuvo una edad media de 45 años, siendo 25 % hombres y 75 % mujeres. Todos los pacientes dieron consentimiento escrito voluntario para participar de estudios genéticos.

Extracción de ADN

Se procedió a extraer ADN de las muestras recolectadas a partir de 200 µl de sangre entera mediante el kit comercial "ADN High Pure PCR Template preparation Kit" (Roche, Bs.As., Argentina) según instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue conservado a -20 °C hasta su utilización.

Cuantificación de ADN

Se llevó a cabo la cuantificación de ADN presente en las muestras extraídas mediante el equipo Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), utilizando el termociclador en tiempo real Rotor Gene Q Series según indicaciones del fabricante. Todas las muestras utilizadas en este estudio presentaron una concentración de ADN entre 8 y 140 ng/µl de ADN. En las reacciones de PCR se utilizaron entre 20 y 50 ng de ADN.

Genotipificación de los polimorfismos del transportador y receptor 2a de serotonina

Con el fin de estudiar los polimorfismos 5-HTTLPR y 5-HTTVNTR y el SNP 1438 A/G del 5-HTR2A se comenzó por poner a punto metodologías para la detección

de los mismos en base a datos bibliográficos. El primer paso consistió en corroborar si los cebadores encontrados en la bibliografía amplificaban específicamente la región correspondiente al gen de interés mediante la utilización del *Software* de acceso libre *Primer BLAST* del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) contra el genoma humano.

Polimorfismos del 5-HTT

Mediante una búsqueda bibliográfica se eligieron diferentes sets de cebadores para realizar la puesta a punto de las amplificaciones por PCR; los **cebadoresseleccionados** figuran en la Tabla 1. Luego de realizar pruebas de validación con los distintos pares de cebadores se seleccionaron para los estudios de genotipificación del polimorfismo 5-HTTLPR los que amplifican un fragmento de 181 pb para el alelo L y de 137 pb para el alelo S. En el caso del polimorfismo 5-HTTVNTR se seleccionaron para los estudios de genotipificación los que amplifican un fragmento de 386 pb para el alelo 12 y de 356 pb para el alelo 10 y 341 pb para el alelo 9. Una vez puestas a punto las reacciones de PCR para la genotipificación de ambos polimorfismos del transportador de serotonina, se estudiaron 384 pacientes ambulatorios.

Las amplificaciones por PCR del polimorfismo 5-HTTLPR se llevaron a cabo en un termociclador VERITI (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con una mezcla preformada (2G Kapa multiplex Biosystems, Kapa Biosystems, Boston, Ma, EE.UU.) y optimizada de todos los componentes de la reacción, exceptuando **cebadoresmoldes** y agua. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C y 30 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 65 °C y 15 s a 72 °C. Mientras que las reacciones de PCR del polimorfismo 5-HTTVNTR realizaron en el equipo Rotor Gene (Qiagen, Hilden, Alemania) con una mezcla preformada (Kapa Fast, Biosystems, Boston, Ma, EE.UU.) y optimizada de todos los componentes de la reacción exceptuando cebadores, moldes, Cl₂Mg y agua. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C y 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 20 s a 61 °C y 20 s a 72 °C. En ambos casos el volumen final de la mezcla de reacción fue de 20µl. Los alelos fueron distinguidos por su peso molecular mediante electroforesis en gel de agarosa 3,5 % teñido con bromuro de etidio y revelado por luz UV. En cada reacción de PCR, se procesaron como controles internos muestras heterocigotas (LS, 10:12) y homocigotas (LL y SS; 10:10 y 12:12) para ambos polimorfismos.

Tabla 1. Pares de cebadores utilizados para la puesta a punto de la detección del 5-HTTLPR y 5-HTTVNTR.

| Polimorfismo | | Secuencia de <i>primers</i> (5'→3') | Tamaño del amplicón esperado | Referencia |
|--------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|
| 5-HTTLPR | Fw | TTCACCCCTCGCGGCAT | Alelo L 528 pb | Martinez-Barrondo <i>et al.</i> , 2005 |
| | Rv | GGGGATATTGGGGGTTGCAGGG | Alelo S 484 pb | |
| | Fw | GGCGTTGCCGCTCTGAATGC | Alelo L 529 pb | Haase <i>et al.</i> , 2013 |
| | Rv | GAGGGACTGAGCTGGACAACCA | Alelo S 491 pb | |
| | Fw | GCAACCTCCCAGCAACTCCCTGTA | Alelo L 181 pb | Hu <i>et al.</i> , 2006 |
| | Rv | GAGGTGCAGGGGGATGCTGGAA | Alelo S 137 pb | |
| 5-HTTVNTR | Fw | GTCAGTATCACAGGCTGCGAG | Alelo 9 254 pb | Kohen <i>et al.</i> , 2008 |
| | Rv | TGTTCTAGTCTTACGCCAGTG | Alelo 10 269 pb | |
| | | | Alelo 12 299 pb | |
| | Fw | TGGATTCCTTCTCTCAGTGATTGG | Alelo 9 345 pb | Maestrini <i>et al.</i> , 1999 |
| | Rv | TCATGTTCTAGTCTTACGCCAGTG | Alelo 10 360 pb | |
| | | | Alelo 12 390 pb | |
| | Fw | ATACTGGTAGGGTGCAAGGAGA | 380 pb – no amplifica en intrón | Drtilkova <i>et al.</i> , 2010 |
| | Rv | CTCTGAATGCCAGCACCTAAC | | |
| | Fw | GTCAGTATCACAGGCTGCGAG | Alelo 9 297 pb | Martinez-Barrondo <i>et al.</i> , 2005 |
| | Rv | TCATGTTCTAGTCTTACGCCAGTG | Alelo 10 282 pb Alelo 12 302 pb | |
| Fw | TGGATTCCTTCTCTCAGTGATTGG | Alelo 9 341 pb | Maestrini <i>et al.</i> , 1999 | |
| Rv | TGTTCTAGTCTTACGCCAGTG | Alelo 10 356 pb Alelo 12 386 pb | | |

Polimorfismo 1438 GA del receptor 2A de serotonina

El SNP 1438 A/G en el gen *5-HTR2A* se analizó utilizando la metodología de PCR-RFLP mediante digestión con la enzima de restricción MspI. Las amplificaciones se llevaron a cabo con el par de cebadores Fw 5'CTGGGTGGCATATTTCTGCT'3 y Rv 5'ACCAAGGGACTCCTGGTTTC'3 (Kim *et al.*, 2008) en un termociclador VERITI (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con una mezcla preformada (2G Kapa multiplex Biosystems, Wilmington, Ma, EE.UU.) y optimizada de todos los componentes de la reacción, exceptuando cebadores, moldes y agua, en un volumen final de 20 µL. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C y 30 ciclos de 25 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 20 s a 72 °C. El fragmento amplificado de 513 pb fue digerido con la enzima MspI durante 3 hs a 37 °C, verificándose previamente la presencia del amplicón mediante una corrida electroforética con la mitad del volumen de reacción. Posterior a la digestión enzimática, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 3,5

% teñido con bromuro de etidio y se reveló por Luz UV, diferenciando los alelos por el patrón de bandas obtenido: dependiendo la presencia o ausencia del sitio de corte para MspI se obtiene un fragmento de 513 pb para el alelo A o dos fragmentos de 331 pb y 182 pb para el alelo G. En cada reacción de PCR se procesaron como controles internos muestras heterocigotas (GA) y homocigotas (GG y AA).

Con el fin de corroborar la correcta genotipificación, algunos productos de PCR de 513 pb correspondientes a pacientes con distinto genotipo según PCR-RFLP, fueron purificados y secuenciados. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en un equipo CEQ 2000XL de Beckman Coulter (secuenciador de ADN de 8 capilares de 33 cm de longitud, 75µm id), siguiendo los protocolos del fabricante. Una vez recibidas las secuencias se analizaron los electroferogramas mediante el programa *Sequence Scanner V1.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Adicionalmente, se planeó evaluar la utilidad de una metodología post-PCR de *High Resolution Melting* (HRM) para la detección del polimorfismo 1438 A/G

del *5-HTR2A* a partir del diseño de cebadores propios mediante el *Software Primer Premier* (PREMIER Biosoft International). Como primer paso, en algunas muestras ya genotipificadas por PCR-RFLP o secuenciación, se realizó una amplificación por PCR en tiempo real con el intercalante fluorescente Evagreen (Kapa Fast HRM, Biosystems, Boston, Ma, EE.UU.) y con los cebadores diseñados (Fw 5'CACTGTTGGCTTTGGATG'3 y Rv 5' TTAGGCTGAAGGGTGAAG'3) que permitieron amplificar un fragmento de 99 pb que contiene al polimorfismo bajo estudio. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 2 min de 95 °C y 45 ciclos de 10 s a 95 °C, 15 s a 54 °C y 20 s a 72 °C. Una vez finalizada la amplificación se efectuó el análisis por HRM mediante el programa Rotor Gene Q Series.

Análisis estadístico

En base a los resultados obtenidos mediante la genotipificación de los pacientes ambulatorios se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de los tres polimorfismos bajo estudio evaluando su apartamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg bajo el test de Chi-cuadrado (X^2) con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Puesta a punto de metodologías para la detección de los polimorfismos del receptor 2A y transportador de Serotonina

Polimorfismos del 5-HTT

Para estudiar el 5-HTTLPR se comparó la utilidad de tres juegos de cebadores. El único par de cebadores que permitió la correcta genotipificación fue el utilizado por Hu *et al.* (2006) que amplifican fragmentos de 181 pb para el alelo L y de 137 pb para el alelo S. Al utilizar los cebadores descritos por Haase *et al.* (2013) se observaron bandas inespecíficas en todas las temperaturas del gradiente probado (62 °C, 63 °C, 64 °C y 65 °C). El último par de cebadores probado reportados por Martínez-Barrondo *et al.* (2005) mostró inespecificidad en todas las pruebas. Adicionalmente, mostraron inconsistencias en cuanto a la región amplificada al estudiarlos mediante *software* de bioinformática o mediante análisis bioinformático. En el caso del polimorfismo correspondiente al VNTR del intrón 2 del gen *SLC6A4* se utilizaron para la puesta a punto un total de 5 juegos de cebadores. Cuatro combinaciones

se obtuvieron por bibliografía, mientras que el quinto par, que fue el seleccionado, se obtuvo tras combinar los cebadores *Forward* y el *Reverse* de dos de los trabajos anteriores. De los cuatro pares de cebadores analizados sólo dos amplificaron la región de interés, permitiendo identificar los distintos alelos en base a su peso molecular. Debido a la poca intensidad de las bandas obtenidas al utilizar el set de cebadores empleados por Martínez-Barrondo *et al.* (2005) se decidió seleccionar para la genotipificación el juego de cebadores que resultó de la combinación propia, mediante el cual se obtuvieron bandas de 386 pb para el alelo 12 y de 356 pb para el alelo 10. A diferencia de lo que ocurrió para el 5-HTTLPR, tras examinar el fragmento que amplifica cada juego de cebadores mediante *software* bioinformáticos, se observó que el obtenido de la fuente Drtilkova *et al.* (2010), si bien amplifica una región del gen en estudio, no se corresponde con el segmento donde se localiza el polimorfismo de interés.

Polimorfismo 1438 GA del receptor 2A de serotonina

Para el estudio del polimorfismo 1438 G/A del receptor 2A de serotonina en todos los pacientes, se utilizó la técnica PCR-RFLP.

Como se describió en la sección Materiales y Métodos, se planeó desarrollar una metodología de HRM para la detección del polimorfismo 1438 A/G del *5-HTR2A*. En la validación de esta técnica se diseñaron cebadores propios y se evaluaron los resultados de la amplificación en base a los niveles de fluorescencia observados tras la amplificación PCR *Real Time* y además se corroboró la correcta amplificación mediante la corrida electroforética de los productos de PCR. Una vez optimizada la reacción, se llevó a cabo el análisis de *melting* de alta resolución post-PCR con un rango de temperatura de entre 75-90 °C; se esperaba que las muestras procesadas pudieran ser clasificadas según el genotipo para el polimorfismo de interés. Para el análisis en los ensayos de HRM, como primera medida, luego de cada amplificación se normalizaron las lecturas de fluorescencia. Para ello se utilizó el *software* Rotor Gene Q Series que permitió identificar áreas de pre- y post-*melting* en la zona estable de fluorescencia. Luego, se normalizó con respecto a un control homocigota (GG-AA) y a un control heterocigota y el *software* Rotor Gene Q Series estableció el genotipo de cada muestra analizada.

Si bien la amplificación y el análisis post-PCR pudo desarrollarse, la genotipificación por esta técnica no fue correcta para algunas muestras. En base al análisis de la

secuencia de estos pacientes se comprobó que aquellos que fueron clasificados de forma errónea presentaban a 18 pb del 1438 G/A, el SNP rs6306 (1420 T/C) el cual muestra poca asociación con la respuesta a los ISRS (Cusin *et al.*, 2002). Según la base de datos su frecuencia es bastante baja a nivel mundial, varía entre el 0 % y el 12 % (ALFRED, 2016a). La presencia del SNP 1420T/C, genera un cambio en la curva de *melting* semejante al generado por el SNP 1438 G/A, impidiendo la correcta clasificación de las muestras mediante HRM. De modo que la misma no es la técnica adecuada para la genotipificación del SNP 1438 G/A dada la presencia del otro SNP en nuestra población. Cabe recalcar que es la primera vez que se reporta la existencia de este SNP en la población argentina. Como consecuencia de lo anteriormente descripto, para

la genotipificación en el presente estudio se utilizó en su totalidad la metodología PCR-RFLP.

Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas

Una vez que se pusieron a punto las metodologías para la genotipificación de los tres polimorfismos objeto de estudio del presente trabajo, se obtuvieron los perfiles genéticos de las 384 muestras procedentes de pacientes ambulatorios, permitiendo calcular las frecuencias alélicas y genotípicas y por ende, lograr estimar la distribución de frecuencias de estos polimorfismos en la población marplatense (Tabla 2). Para el 5-HTTVNTR, el alelo 9 fue hallado en un sólo paciente con genotipo 10:9, por lo cual no se tuvo en cuenta para el cálculo de frecuencias.

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas y cálculo de EWH en los polimorfismos de transportador y receptor 2A de serotonina en la población marplatense.

| Polimorfismo | Frecuencia genotípica (%) | | | Frecuencia alélica (%) | | EWH | |
|--------------|---------------------------|-------|-------|------------------------|-------|-----|----------------|
| | SS | SL | LL | S | L | gL | X ² |
| 5-HTTLPR | 21% | 61% | 18% | 51% | 49% | 1 | 16,65 |
| | 10:10 | 10:12 | 12:12 | 10 | 12 | | |
| 5-HTTVNTR | 17% | 41% | 42% | 37,5% | 62,5% | 1 | 5,43 |
| | GG | AG | AA | G | A | | |
| 1438 G/A | 36% | 47% | 17% | 59,5% | 40,5% | 1 | 0,47 |

DISCUSIÓN

El Proyecto Genoma Humano, publicado en 2003, permitió conocer la secuencia completa del ADN y realizar estudios sobre la estructura y funcionalidad de los genes. Con el conocimiento de la existencia de la gran variación interindividual, se comenzaron a analizar y comprender por qué a pesar del desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos, aparentemente más seguros y eficaces, sigue existiendo una gran variabilidad de respuesta entre los pacientes. A partir de estos nuevos avances se vislumbró la idea de comenzar a personalizar los tratamientos en base al

perfil genético del paciente, que es lo que se conoce como farmacogenética. Dado que el área farmacogenética se encuentra aún en desarrollo en la mayoría de las disciplinas en las que se aplica, las investigaciones en este campo se focalizan inicialmente en obtener resultados poblacionales (Daar y Singer, 2005; Nelson *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2014; Keers y Aitchison, 2011; Malhotra *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se lograron poner a punto metodologías que permitieron estudiar los polimorfismos mencionados del transportador y receptor 2A de serotonina distinguiendo con exactitud los genotipos de todas las muestras analizadas. Se debe recalcar la importancia de

cumplir con todos los pasos necesarios para la optimización de las reacciones de PCR en el momento de la puesta a punto. Los análisis bioinformáticos son fundamentales a la hora de seleccionar los mejores cebadores para poder validar estas reacciones. Como se describió en la sección de resultados, se encontraron discrepancias entre el análisis *in silico* y el material bibliográfico hallado para la genotipificación de las dos variantes alélicas del transportador de serotonina, 5-HTTLPR y 5-HTTVNTR. Además en este estudio ciertos juegos de cebadores no amplificaron los productos de PCR esperados de manera eficiente, lo que demuestra que las condiciones óptimas de una misma reacción, ya sea por el tipo de termociclador o la mezcla de reacción utilizada, pueden no ser necesariamente idénticas entre un laboratorio y otro.

El análisis llevado a cabo en el presente trabajo constituye el primer trabajo en nuestro país en el cual se estudian simultáneamente las frecuencias alélicas y genotípicas de estos tres polimorfismos en una muestra representativa de nuestra población. Si se comparan las frecuencias alélicas encontradas en la población marplatense para cada polimorfismo estudiado con datos hallados en la bibliografía, se puede ver que lógicamente los valores están dentro del rango esperable en las poblaciones americanas y europeas, pero difiere en gran medida con los encontrados en las poblaciones africanas y asiáticas (Sitte y Freissmuth, 2006; ALFRED, 2016b). Para el 5-HTTLPR, si se analizan las frecuencias tanto alélicas como genotípicas obtenidas en marplatenses en relación a las obtenidas para la población rosarina, único estudio disponible a nivel nacional, se observa un mayor porcentaje de heterocigotas en la población marplatense, mientras que el alelo S se ve mayormente representado en ambas poblaciones en comparación al alelo L (Ostera *et al.*, 2014). Al igual que en otras poblaciones, el alelo 9 del 5-HTTVNTR tiene muy baja frecuencia (Sitte y Freissmuth, 2006), por lo que se debería evaluar su utilidad en el desarrollo de tests farmacogenéticos para la respuesta a los ISRS.

Sería relevante desarrollar en un futuro un test farmacogenético que permita identificar el mejor tratamiento para los pacientes en base a los polimorfismos aquí analizados, ya que las variantes alélicas más frecuentes en los pacientes psiquiátricos no respondedores se encuentran representadas en la población general. Esto estaría indicando que es probable que un gran porcentaje de la población pueda llegar a presentar efectos adversos o no responder al tratamiento con ISRS en caso que lo requieran en algún momento de su vida.

BIBLIOGRAFÍA

- ALFRED (2016a) http://alfred.med.yale.edu/alfred/SiteTable1A_working.asp?siteuid=SI479410Z Accessed november 2016.
- ALFRED (2016b) https://alfred.med.yale.edu/alfred/SiteTable1A_working.asp?siteuid=SI479444G. Accessed november 2016.
- Artiga F. (1997) El transportador de serotonina como diana terapéutica. *Rev. Psicofarm.* 2: 13-19.
- Bogad J.A. (2008) Revisión sistemática de estudios farmacogenéticos de antipsicóticos y antidepresivos. Universidad Nacional de Asunción, Uruguay.
- Caspi A., Sugden K., Moffitt T.E., Taylor A., Craig I.W., Harrington H., McClay J., Mill J., Martin J., Braithwaite A., Poulton R.A. (2003) Influence of Life Stress on Depression: Moderation by a Polymorphism in the 5-HTT Gene. *Rev. Science* 301 (5631): 386-389. doi: 10.1126/science.1083968.
- Cusin C., Serretti A., Zanardi R. (2002) Influence of monoamine oxydase A and serotonin receptor 2A polymorphisms in SSRIs antidepressant activity. *Int. J. Neuropsychopharmacology* 5: 27-35. doi:10.1017/S1461145701002711.
- Daar A.S., Singer P.A. (2005) Pharmacogenetics and geographical ancestry: implications for drug development and global health. *Nat. Rev. Genet.* 6 (3): 241-246. doi: 10.1038/nrg1559.
- Drtilkova I., Neumannova M., Theiner P., Filova A., Lochman J., Castulik L., Sery O. (2010) The VNTR Polymorphism of the Serotonin Transporter Gene Predisposes Czech Boys to Hyperkinetic Disorders. *Act. Nerv. Super Rediviva* 52 (2): 157-162.
- Gonda X., Rihmer Z., Zsombok T., Bagdy G., Akiskal K.K., Akiskal H.S. (2006) The 5HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene is associated with affective temperaments as measured by TEMPS-A. *Rev. J. Affect. Disord.* 91 (2-3): 125-131. doi: 10.1016/j.jad.2005.12.048.

- Haase C.M., Saslow L.R., Bloch L., Saturn S.R., Casey J.J., Seider B.H., Lane J., Coppola G., Levenson R.W. (2003) The 5-HTTLPR polymorphism in the serotonin transporter gene moderates the association between emotional behavior and changes in marital satisfaction over time. *Emotion* 13 (6): 1068-1079. doi: 10.1037/a0033761.
- Hranilovic D.L., Stefulj J., Schwab S., Borrmann-Hassenbach M., Albus M., Jernej B., Wildenauer D. (2004) Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. *Biol. Psychiatry* 55 (11): 1090-1094. doi: 10.1016/j.biopsych.2004.01.029.
- Hu X.Z., Lipsky R.H., Zhu G., Akhtar L.A., Taubman J., Greenberg B.D., Xu K., Arnold P.D., Richter M.A., Kennedy J.L., Murphy D.L., Goldman D. (2006) Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 78 (5): 815-826. doi: 10.1086/503850.
- Keers R., Aitchison K.J. (2011) Pharmacogenetics of antidepressant response. *Expert Rev. Neurother.* 11 (1): 101-125. doi: 10.1586/ern.10.186.
- Kim K., Woo H., Lim S. (2008) Association Study of a Serotonin Receptor 2A Gene 1438A/G Polymorphism and Anxiety-Related Traits. *Rev. Psychiatry Invest.* 5: 244-246. doi: 10.4306/pi.2008.5.4.244.
- Kohen R., Cain K.C., Mitchell P.H., Becker K., Buzaitis A., Millard S.P., Navaja G.P., Teri L., Tirschwell D., Veith R. (2008) Association of serotonin transporter gene polymorphisms with poststroke depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 65 (11): 1296-1302. doi: 10.1001/archpsyc.65.11.1296.
- Looper K.L. (2007) Potential medical and surgical complications of serotonergic antidepressant medications. *Psychosom.* 48 (1): 1-9. doi: 10.1176/appi.psy.48.1.1.
- Maestrini E., Lai C., Marlow A., Matthews N., Wallace S., Bailey A., Cook E.H., Weeks D.E., Monaco A.P. (1999) Serotonin transporter (5-HTT) and γ -aminobutyric acid receptor subunit β 3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. *Am. J. Med. Genet.* 88 (5): 492-496.
- Malhotra A.K., Murphy G.M. Jr., Kennedy J.L. (2004) Pharmacogenetics of Psychotropic Drug Response. *Am. J. Psychiatry* May, 161 (5): 780-796. doi: 10.1176/appi.ajp.161.5.780.
- Martinez-Barrondo S., Saiz P.A., Morales B., Garcia-Portilla M.P., Coto E., Álvarez V., Bobes J. (2005) Serotonin gene polymorphisms and panic disorder. *Actas Esp. Psiquiatr.* 33 (4): 210-215.
- Nelson M.R., Bryc K., King K.S., Indap A., Boyko A.R., Novembre J. (2008) The Population Reference Sample, POPRES: a resource for population, disease and pharmacological genetics research. *Am. J. Hum. Genet.* 83: 347-358. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.08.005.
- Ostera D., Pugliesi M., Scrigna J. (2014) Determinación de la frecuencia alélica de polimorfismo en la región promotora del gen del transportador de serotonina. *Informe ALAC* 2: 14.
- Pereira M.A., Cavallari L.H., Johnson J.A. (2014) Warfarin pharmacogenetics: an illustration of the importance of studies in minority populations. *Clin. Pharmacol. Ther.* 95 (3): 242-244. doi: 10.1038/clpt.2013.209.
- Rakel D. (2009) *Medicina integrativa*. In: Elsevier (Ed.) *Depresión*. 2nd Edition. Barcelona, España, pp. 75-83.
- Sitte H., Freissmuth M. (2006) *Neurotransmitter Transporters*. Editorial Springer, Alemania, pp. 345.
- Smits K.M., Smits L.J.M., Schouten J.S.A.G., Stelma F.F., Nelemans P., Prins M.H. (2004) Influence of SERTPR and STin2 in the serotonin transporter gene on the effect of selective serotonin reuptake inhibitors in depression: a systematic review. *Mol. Psychiatry* 9 (5): 433-441. doi: 10.1038/sj.mp.4001488.
- Stevenson J.M., Bishop J.R. (2013) Antidepressant Tolerability and Potential Clinical Implications of Serotonin-2A Genotypes. *Clin. Pharmacol. Biopharm.* 2: 109. doi:10.4172/2167-065X.1000109.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por FONTAR ANR 800/2011 N° 0094/11 (ANPCyT). Agradecemos especialmente a Martín Quintana y Sofía Pérez Maturo por sus útiles consejos en la corrección de este manuscrito.