



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**“Estudios de asociación basado en familias entre el gen
SLC6A4 y el trastorno obsesivo compulsivo”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

JUAN CARLOS GUSTAVO OLAIZ BARRAGÁN



MÉXICO, D.F.

2009



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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof: Dr. Jorge Vázquez Ramos
Vocal	Prof: Dr. Homero Hernández Montes
Secretario	Prof: Dra. Beatriz Elena Camarena Medellín
1er. Suplente	Prof: Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta
2º. Suplente	Prof: Dr. Oscar Armando Pérez Méndez

Esta tesis se desarrolló en el: “Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente”

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Beatriz Elena Camarena Medellín

Nombre completo y firma del sustentante:

Juan Carlos Gustavo Olaiz Barragán

Índice.

	Página
<i>Índice de tablas.</i>	5
<i>Índice de figuras.</i>	6
<i>Tabla de abreviaturas.</i>	8
<i>1.- Introducción a la Genética Psiquiátrica.</i>	9
<i>2.- El Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC).</i>	12
<i>2.1.- Definición del Trastorno Obsesivo Compulsivo.</i>	
<i>2.2.- Generalidades.</i>	
<i>2.2.1.- Sintomatología del TOC.</i>	
<i>2.2.2.- Etiología del TOC.</i>	
<i>2.3.- Estudios de Epidemiología Genética Básica.</i>	
<i>2.3.1.- Estudios en familias.</i>	
<i>2.3.2.- Estudios en gemelos.</i>	
<i>2.3.3.- Estudios en adopción.</i>	
<i>2.4.- Estudios de segregación.</i>	
<i>2.5.- Análisis de ligamiento.</i>	
<i>2.6.- Estudios de asociación genética.</i>	
<i>2.6.1.- Estudios de asociación de caso control.</i>	
<i>2.6.2.- Estudios de asociación basados en familias.</i>	
<i>2.6.3.- Estudios genéticos del TOC.</i>	
<i>3.- El sistema serotoninérgico.</i>	26
<i>3.1.- Metabolismo de la serotonina.</i>	
<i>3.2.- El sistema serotoninérgico y las enfermedades mentales.</i>	
<i>3.3.- El gen del transportador de serotonina SLC6A4.</i>	
<i>3.4.- Estudios de 5-HTTLPR en TOC.</i>	

Índice.

	Página
4.- <i>Diseño Experimental.</i>	39
4.1.- <i>Planteamiento.</i>	
4.2.- <i>Hipótesis.</i>	
4.3.- <i>Objetivos generales y específicos.</i>	
4.4.- <i>Metodología.</i>	
4.4.1.- <i>Descripción de la muestra.</i>	
4.4.2.- <i>Extracción del ADN a partir de sangre periférica.</i>	
4.4.3.- <i>Cuantificación de ADN.</i>	
4.4.4.- <i>Análisis del 5-HTTLPR.</i>	
4.4.5.- <i>Análisis estadístico (H-W, TDT y FBAT).</i>	
4.4.6.- <i>Análisis de casos y controles.</i>	
4.4.7.- <i>Análisis por FBAT.</i>	
5.- <i>Resultados.</i>	52
5.1.- <i>Análisis de los genotipos mediante el método de casos y controles.</i>	
5.2.- <i>Análisis de los genotipos mediante el método de pacientes vs. controles.</i>	
6.- <i>Discusión.</i>	54
7.- <i>Conclusiones.</i>	57
8.- <i>Bibliografía.</i>	58
8.1.- <i>Páginas Web consultadas.</i>	
9.- <i>Apéndice.</i>	66
9.1.- <i>Criterios DSM-IV para el diagnóstico del trastorno obsesivo compulsivo.</i>	
9.2.- <i>Soluciones utilizadas en este estudio.</i>	
10. <i>Glosario.</i>	69

Índice de tablas.

Página

Tabla 1: Paradigmas utilizados en el estudio de la Genética Psiquiátrica.	10
Tabla 2: Tipos de estudios que se utilizan en la Genética Psiquiátrica.	18
Tabla 3: Fenotipos asociados a “knockout” a los receptores de serotonina en ratón.	31
Tabla 4: Patrón de bandas del polimorfismo 5-HTTLPR utilizando la enzima <i>MspI</i> .	36
Tabla 5: Frecuencias alélicas de las muestra estudiada.	53
Tabla 6: Análisis de la transmisión de alelos por FBAT del polimorfismo 5-HTTLPR.	53

Índice de figuras.

	Página
Figura 1: Ejemplo ilustrado de caso obsesivo-compulsivo de aseo.	12
Figura 2: Ejemplo ilustrado de caso obsesivo-compulsivo donde se muestra la obsesión de revisar tareas varias veces.	15
Figura 3: La estructura química del triptófano.	26
Figura 4: La estructura química de la serotonina.	27
Figura 5: Ruta metabólica para la síntesis de serotonina a partir del triptófano.	29
Figura 6: Se muestra una ilustración de la proteína transportadora de serotonina.	32
Figura 7: Gen SLC6A4 desglosando al polimorfismo 5-HTTLPR.	33
Figura 8: Esquema de los alelos del polimorfismo 5-HTTLPR.	34
Figura 9: Nomenclatura propuesta por Nakamura para el polimorfismo 5-HTTLPR.	35
Figura 10: Esquema de los alelos de la sustitución A→G polimorfismo rs25551.	36
Figura 11: Patrón de bandas para el sistema bialélico.	47
Figura 12: Estudio de asociación de casos y controles.	49
Figura 13: Estudio de asociación basados en familia.	50
Figura 14: Fotografía del gel mostrando el sistema bialélico.	52
Figura 15: Esquema de los niveles de organización celular hasta llegar al ADN.	70
Figura 16: Ejemplo ilustrativo de un VNTR.	73

Índice de figuras.

	Página
Figura 17: Proceso de cada ciclo realizado en el termociclador al realizar una PCR.	75
Figura 18: El algoritmo numérico del producto de interés obtenido durante cada ciclo de PCR que se realice.	76
Figura 19: Esquema que muestra el proceso de PCR	77
Figura 20: Esquema del bromuro de etidio, que revela al UV al ADN al ser un intercalador de bases.	79
Figura 21: Esquema del proceso global de cómo se realiza la electrofóresis.	79

Tabla de abreviaturas.

Abreviatura	Significado
DSM-IV	Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales
ICD-10 ó CIE-10	Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y otros Problemas de Salud
TOC	Trastorno Obsesivo Compulsivo
ISRS	Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina
5-HT	5-hidroxi-triptamina, serotonina
5-HTT	Transportador de Serotonina
SLC6A4	[Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter, Serotonin), Member 4]. Gen que enmarca una proteína integral de membrana que transporta a la serotonina del espacio sináptico al interior de las neuronas presinápticas.
RPBI	Residuos Peligrosos Bioinfecciosos
TDT	Prueba de Desequilibrio de la Transmisión
HRR	Riesgo Relativo por Haplotipo
F-BAT	Prueba de Asociación basado en Familia (Family Based Association Tests)
PDT	Prueba de Desequilibrio de Pedigrí
MAO	Enzima Monoamino Oxidasa

1.- Introducción a la Genética Psiquiátrica.

La Genética Psiquiátrica se auxilia en métodos de la Biología Molecular para estudiar enfermedades psiquiátricas. El estudio de estas enfermedades es una de las más grandes áreas en expansión dentro del campo de la investigación neurocientífica. Al igual que muchas aproximaciones genéticas, la Genética Psiquiátrica ofrece una ruta competente y atractiva para la investigación de etiologías psiquiátricas, cuya patogénesis sea aún desconocida. Sin embargo, el prospecto de que los genes estén involucrados en las conductas, tanto normales como anormales, no ha dejado de generar controversia.

La idea de que haya un componente hereditario que intervenga en las enfermedades mentales es antigua y coloquial, no obstante, no se había refrendado sino hasta que la Genética Psiquiátrica quedó establecida como ciencia. Una de las suposiciones fundamentales de estudiar la Genética Conductual es que se presente la agregación familiar (estudio basado en familia); esto significa que el rasgo (o la conducta misma) en estudio posee un componente de origen genético.

Se ha sugerido que la etiología de los trastornos de la conducta puede explicarse parcialmente a partir de la presencia de genes y su interacción con el ambiente. En este caso se sugiere que la carga genética del individuo es uno de los diversos factores de riesgo que pueden desencadenar la enfermedad, es decir, la interacción de dicha carga genética con el medio ambiente hace posible que la enfermedad se establezca (**López, 2002**).

Otros autores del área de la Genética Psiquiátrica divulgan que muchas enfermedades psiquiátricas y neurológicas se manifiestan por un componente genético. La elaboración del historial familiar de síntomas neuropsiquiátricos puede resultar muy útil para establecer el diagnóstico diferencial, así como su tratamiento. Se conoce que el desarrollo de enfermedades como la demencia, la ansiedad, la depresión y la esquizofrenia se ve incrementado en parentescos de primer grado al afectado, es decir, hermanos, padres e hijos (**Dilip, 2006**).

Para desenvolverse, la Genética Psiquiátrica se auxilia de distintos paradigmas, cada uno con distintas fortalezas y debilidades. En la siguiente tabla 1 se muestran brevemente estos cuatro paradigmas.

Tabla 1: Paradigmas utilizados en el estudio de la Genética Psiquiátrica.

Los 4 mayores paradigmas de la Genética Psiquiátrica			
Paradigma	Muestras estudiadas	Método de muestreo	Finalidad científica
Genética Epidemiológica Básica	Estudios en familia, gemelos y estudios de adopción	Estadístico	Cuantificar el grado de agregación familiar y/o heredabilidad
Genética Epidemiológica Avanzada	Estudios en familia, gemelos y estudios de adopción	Estadístico	Explorar la naturaleza y la influencia de los factores de riesgo genéticos
Búsqueda de genes candidatos	Alta densidad de familias, tríos y muestras de caso-control	Estadístico	Determinar la localización genómica y la identidad de genes de susceptibilidad
Genética Molecular	Individuos	Biológico	Identificar variantes de ADN críticos y rastrear la ruta biológica desde el ADN hasta el trastorno

Adaptado de Kendler, 2005

Como su puede apreciar, una de las metodologías más comunes en la búsqueda de genes candidatos son los estudios de casos y controles. Al utilizarse alguno de los paradigmas biológicos, se debe tomar en cuenta que están limitados en el aspecto que ellos no consideran factores de riesgo genéticos. La existencia de éstos es inferida por patrones, es decir, a partir de la semejanza en la transmisión de una enfermedad entre clases particulares de familiares. Tal es el caso, por ejemplo, de gemelos monocigotos y dicigotos, o también de padres biológicos y adoptivos con los hijos (**Kendler, 2005**). Para realizar este estudio hemos seguido el paradigma de búsqueda de genes, pues resulta el más adecuado a nuestro propósito.

En la literatura sobre genética conductual se manifiesta una marcada preocupación por diferenciar los orígenes ambientales y genéticos de la conducta, para comprender mejor las diferencias específicas entre individuos. Esta disciplina complementa armoniosamente la labor de la investigación genética psiquiátrica, pues aporta un método muy apto para estudiar los trastornos mentales, y su diseño permite identificar fácilmente la etiología de estas enfermedades, así como la etiología del desarrollo *normal* del humano.

Los genetistas conductuales parten del hecho que tanto los genes como el ambiente afectan al comportamiento, esta visión es comúnmente aceptada en la literatura psicológica. Hay copiosos estudios en torno a esta teoría, que demuestran claramente la influencia tanto del

genotipo como del ambiente interactuando en diversos fenotipos psicológicos cuantificables **(DiLalla, 2004)**.

El campo de la genética conductual ofrece una perspectiva novedosa y rica de los fenómenos psicológicos, tal que, cuestiona y esclarece a la sabiduría convencional. Por ejemplo, desmiente el prejuicio del desempeño académico de los hijos basado en el de los padres, cuando en realidad sólo un ambiente familiar y una genética adecuados resultan en un óptimo desempeño en los estudios.

Una importante meta de la Genética Conductual y la Genética Psiquiátrica es entender la forma en que los genes y el ambiente interactúan para determinar la conducta del individuo.

La Genética Conductual utiliza en el humano diversas metodologías para estudiar el origen de las diferencias conductuales. El problema que enfrentan estos métodos es distinguir claramente la influencia genética de la ambiental en las conductas estudiadas. Es imposible realizar un experimento que separe perfectamente esta interacción (la ética humana simplemente no lo permite), sin embargo, encontramos estructuras familiares específicas en nuestra sociedad que permiten al investigador distinguir con mayor claridad estos dos rasgos, y así registrar, finalmente, la relación entre ambos.

Los estudios en que se basa la genética conductual son: los estudios en gemelos, estudios de adopción (ambos, bajo la guía de la epidemiología genética) y la identificación de un gen específico mediante un análisis de ligamiento (estudios de asociación) **(DiLalla, 2004)**.

2.- El Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC).

2.1.- Definición del Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC).

El Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC) es una enfermedad psiquiátrica que se diagnostica mediante criterios fijos establecidos en manuales, como el de diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales DSM-IV (versión norteamericana) y el manual de descripción clínica y guías de diagnósticos ICD-10 o CIE-10 en español (respaldado por la Organización Mundial de la Salud). En la figura 1 se ilustra un ejemplo del TOC.

Figura 1: Ejemplo ilustrado de una conducta obsesivo-compulsiva de aseo.



El DSM-IV cataloga a este padecimiento dentro del apartado de trastornos de ansiedad, caracterizado tanto por la manifestación de una obsesión (que pueda ocasionar ansiedad o un malestar significativo y persistente), y la compulsión resultante (cuyo propósito es neutralizar dicha ansiedad). Finalmente, la compulsión es la resolución a la obsesión (**DSM-IV, 1995**). El ICD-10 cataloga al TOC como un conjunto de padecimientos neuróticos relacionados con el estrés y trastornos somatoformos (**ICD-10, 2007**).

Nicolini define este trastorno como la «manifestación de ideas persistentes, o bien, pensamientos, imágenes o impulsos intrusivos». Así pues, estas ideas son ajenas a la voluntad de la persona y provocan sufrimiento al individuo que las experimenta. Estos pensamientos

obsesivos se manifiestan recurrente y prolongadamente, llegando incluso a incapacitar al sujeto en sus casos más severos.

Las obsesiones pueden desarrollar conductas que se ejecutan de manera repetitiva, estereotipada y que son percibidas como innecesarias (inicialmente); dichas conductas son las compulsiones. Este comportamiento compulsivo consume una gran cantidad de tiempo y es una respuesta a una obsesión, pues busca disminuir la ansiedad. Esto no produce alivio, por contra, favorece a mediano plazo que se mantenga e intensifique la conducta compulsiva. El TOC ocasiona incapacidad y sufrimiento debido a la presencia simultánea de la obsesión y la compulsión **(Nicolini, 2002)**.

2.2.- Generalidades.

Al TOC se le considera epidemiológicamente como el cuarto trastorno mental más común, sólo superado por fobias, abusos de sustancias y la depresión. Es tan común como la diabetes mellitus y el asma. Típicamente aparece como un padecimiento crónico fluctuante, esto es, que posee periodos más intensos y otros más laxos.

Se ha sugerido, inclusive, que el desarrollo del TOC esté relacionado con la educación y, especialmente, con la formación religiosa rigurosa de algunos individuos. Es manifiesta esta influencia en la aparición del TOC en el caso, por ejemplo, de Egipto, país que tiene el TOC en el 2.6% de su población. Se cree que la opresión religiosa favorece el desarrollo de compulsiones rituales para contrarrestar los cánones religiosos **(Maj, 2002)**.

Para realizar un diagnóstico efectivo del TOC, se debe distinguir de otros padecimientos como: el trastorno de comportamiento, el de ansiedad, de impulsividad y alucinógeno; debe además considerar el espectro en que se manifiesta el TOC (de acuerdo a la severidad). Se emplean diversas escalas en este diagnóstico que se mencionarán más adelante.

La identificación de subtipos homogéneos en padecimientos psiquiátricos es importante porque posiblemente ayudaría a identificar más fácilmente a las etiologías del mismo. Desafortunadamente, el progreso para identificar los subtipos de TOC ha sido lento e infructuoso. Recientemente, muchos estudios preliminares sugieren acercamientos posibles para reconocer subtipos significativos de TOC. Entre las variables sugeridas para la identificación de éstos se incluyen: relación genealógica, la presencia de tics, la asociación con ciertas comorbilidades de padecimientos psiquiátricos (por ej., depresión).

En el estudio de la genética del TOC se han sugerido clasificaciones, a partir de un consenso en que el TOC no es una condición homogénea, ya sea en su presentación clínica o en sus mecanismos fisiopatológicos. Estas categorías son resultado de un esfuerzo por disminuir la heterogeneidad, precisar el diagnóstico y, en general, mejorar el asesoramiento clínico, las estrategias para su tratamiento y pronosis. Estos subtipos se identificaron en función de género, edad de inicio o asociado a trastornos neurológicos.

En la investigación del TOC en América Latina, se sabe que la prevalencia del TOC en México es de 2.8%, mientras que en Argentina es de 3%, Brasil 2.8%, Puerto Rico 3.2% y en mexicanos estadounidenses es de 2.5%. Este dato nos es útil al notarse que en Hispanoamérica se ven prevalencias similares al tener estas poblaciones ascendencia de la península Ibérica.

La prevalencia por género es 1:1, sin embargo se ha reportado que los varones llegan a presentar este trastorno con mayor severidad y a una edad de inicio más temprana, comparada con la de las mujeres (**Maj, 2002**).

2.2.1.- Sintomatología del TOC.

El trastorno obsesivo, en su manifestación clínica, produce un malestar significativo, pues suponen una pérdida de tiempo notable (debido a que ocupa más de una hora al día). Interfiere con la vida normal del individuo, su rendimiento laboral y sus relaciones sociales. Las obsesiones reemplazan comportamientos productivos y gratificantes, merman el desempeño global del individuo y suelen ocasionar una disminución notable del rendimiento personal en las actividades o tareas cognitivas que requieren concentración, como son la lectura o el cálculo mental. Además, muchos individuos eluden objetos o situaciones que suelen provocar en él la manifestación de obsesiones o compulsiones. Este comportamiento puede generalizarse y limitar severamente la actividad del individuo (**Nicolini, 2002**).

La obsesión se define como una cualidad intrusa e inapropiada. La experiencia que produce la sensación que tiene el individuo de que el contenido de la obsesión es ajeno a su control, no encaja en el tipo de pensamientos que él esperaría tener. El individuo, sin embargo, es capaz de reconocer que estas obsesiones son reflejo de sus propias elucubraciones mentales, pues no son impuestas desde el exterior. El obsesivo intenta con frecuencia evadir estos pensamientos y emociones, o bien neutralizarlos mediante otras ideas o actividades compulsivas (**DSM-IV, 1995**).

presencia significativa de factores genéticos involucrados en el desarrollo de este trastorno (**Dilip, 2006**).

Los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina son medicamentos que permiten regular la recaptura hacia el interior de las neuronas terminales presinápticas. El Bloqueo de esta ruta favorece el incremento en la concentración de monoaminas en el espacio sináptico, provocando un efecto terapéutico de los síntomas obsesivo-compulsivos (**Mycek, 2000**).

La eficacia de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) en el TOC oscila alrededor del cuarenta y el sesenta por ciento (**Nicolini, 2002**). Estos fármacos - clorimipramina, fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, paroxetina y el citalopram, los más comunes- son utilizados para tratar varios padecimientos psiquiátricos –a pesar de la diferencia en la expresión de la conducta que presentan-, desde el trastorno explosivo intermitente, el TOC, el Trastorno Depresivo Mayor, hasta ataques de pánico (**Roth, 2006**). Lo importante para la terapia es evaluar la gravedad de los síntomas del TOC para adecuar el tratamiento farmacológico con ISRS (**Maj, 2002**).

La investigación genético-psiquiátrica, así pues, ha conducido a la hipótesis de que el TOC presenta una disfunción en el sistema serotoninérgico. Los genes a investigar para el estudio del TOC, por tanto, serán aquellos relacionados con la neurotransmisión serotoninérgica. Para la finalidad de esta tesis se estudian tres genes.

En primer lugar tenemos al *gen transportador de serotonina* (que se tratará a detalle en el capítulo 3). En segundo lugar tenemos al gen del *receptor de serotonina* y, finalmente, tenemos al *gen de la triptófano hidroxilasa*.

El gen del receptor de serotonina presenta varios subtipos, el 5-HT_{2A} en particular ha resultado decisivo en la etiología y el tratamiento del TOC. La activación de los receptores postsinápticos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} pueden ser la clave en la mejora de los síntomas del TOC después de un tratamiento con ISRS (**Kim, 2006**).

Para corroborar la importancia del receptor 5-HT_{2A} en el TOC, estudios en pacientes han mostrado poco efecto terapéutico al administrar prolactina y cortisol, que son agonistas de 5-HT₂. Algunos investigadores han encontrado que la activación de 5-HT_{2C} induce el comportamiento de autoacicalamiento compulsivo en ratas. Este hallazgo respalda la hipótesis que la estimulación selectiva de receptores 5-HT_{2C} centrales exacerba síntomas obsesivo-compulsivos.

El receptor 5-HT_{1D β} parece ser particularmente importante en la patofisiología del TOC. Éste es un autoreceptor terminal involucrado en la regulación de la síntesis y liberación de

serotonina. Se ha localizado en la región límbica y en el estriado -dentro del núcleo basal- (**Kim, 2006**).

Un estudio reporta que el sumatriptan (agonista ISRS para 5-HT_{1D}β) causaba síntomas de TOC exacerbados. En algunos estudios se ha encontrado asociación entre el gen (alelo G861, específicamente) de este receptor 5-HT_{1D}β con TOC (**Camarena, 2004**), mientras que en otros no se ha reportado esta asociación.

Ahora bien, el *gen de la triptófano hidroxilasa* (gen TPH) codifica la proteína que lleva su nombre y es la enzima que limita la síntesis endógena de serotonina en el sistema nervioso central, pues se ha encontrado que este neurotransmisor no traspasa la barrera hematoencefálica. Así, consideramos que una variante de TPH puede también influir en la disminución de serotonina y prevenir el desarrollo del TOC. Se encontró una relación entre los genes TPH1 y TPH2 con el TOC en tres estudios (**Firsch et al., 2000; Walitza et al., 2004; Mossner et al., 2006**). Los análisis del gen TPH2 (**Mossner et al., 2006**) reportan una transmisión preferencial del haplotipo G-C en pacientes TOC y se ha encontrado además una tendencia de transmisión preferencial del alelo C del SNP rs4565946 en pacientes TOC con una edad de inicio temprana (**Kim, 2006**).

El estudio más importante hasta el momento es el de Barr et al. (1994) que reporta los efectos a corto plazo de la disminución del triptófano (precursor metabólico de la serotonina) en pacientes TOC. Éste muestra claramente una disminución de los síntomas obsesivo-compulsivos en pacientes al administrarles ISRS. Una dieta baja en triptófano no provocó un cambio significativo en el promedio de obsesiones y compulsiones; sin embargo, la tasa de depresión se incrementó significativamente con la disminución de la ingesta de triptófano, en contraste con los controles -pacientes consumiendo suplementos de triptófano- (**Sidransky, 2002**).

2.3.- Estudios de Epidemiología Genética Básica.

La Epidemiología Genética Básica estudia la prevalencia de una enfermedad en una población. En la siguiente tabla se muestra los diferentes tipos de estudio epidemiológico utilizados en la Genética Psiquiátrica.

Tabla 2: Tipos de estudios que se utilizan en la Genética Psiquiátrica.

Estudios de Genética	Epidemiología	Estudios de Asociación (Estudios Moleculares)
Estudios de familias		Casos y controles
Estudios de gemelos		Estudios basados en familia: TDT, FBAT, HRR
Estudios de adopción		

2.3.1.- Estudios en familias.

Los estudios en familia proporcionan el estímulo inicial en la búsqueda de factores genéticos específicos fundamentales en la transmisión del trastorno. El objetivo de estas metodologías es la estimación de la prevalencia y frecuencia de la enfermedad en los miembros de familias afectadas. En el caso que dichas estimaciones sean mayores a las tasas reportadas en la población general, indicarán la presencia de factores genéticos involucrados en el desarrollo del trastorno (**Smoller, 2008**).

Los hallazgos de cinco estudios en familias apoyan la idea de que hay un componente importante en la expresión de este trastorno. Tres estudios incluyeron familias con niños afectados con TOC (**Lenane et al., 1990; Riddle et al., 1990; Leonard et al., 1992**), los otros dos estudios investigaron familias con pacientes adultos (**Bellodi et al., 1992; Black et al., 1992**).

La investigación de Lenane et al. (1990) menciona tres estudios utilizando este tipo de metodología, realizada en cuarenta y cinco parientes de primer grado de cuarenta y seis niños y adolescentes con TOC severo. Los parientes fueron evaluados personalmente con entrevistas psiquiátricas estructuradas y se encontró que el 25% de los padres y el 9% de las madres padecían también TOC.

En otro estudio (**Riddle et al., 1990**), los padres de veintiún niños y adolescentes con TOC fueron entrevistados encontrando que quince (35.7%) de los cuarenta y dos padres recibieron diagnóstico clínico o subclínico de TOC.

Finalmente, un tercer estudio (**Lewis, 1935**) examinó a ciento setenta familiares de primer grado de cincuenta y cuatro probandos con una edad de inicio temprana del TOC (en la niñez), reportando que el 13% de los padres reunían los criterios de diagnóstico del TOC.

Bellodi et al. (1992) publicaron un estudio en noventa y dos pacientes adultos con TOC. La prevalencia registrada de este trastorno fue del 3.4%. Interesantemente, al analizar estos resultados se encuentra que la edad de inicio del TOC fue temprana y las tasas fueron más

elevadas indicando que esta característica clínica pudiera identificar a un subtipo particular del trastorno. El riesgo de padecer TOC entre parientes de los probandos con una edad de inicio temprano fue del 8.8%, comparado al 3.4% observado entre los parientes con edad de inicio tardío (**Bellodi, 1992**).

Cuatro de estos estudios presentaron una limitación seria, que fue la falta de grupos de comparación, por lo que no se puede determinar si las tasas de TOC o de TOC subclínico observadas entre los miembros de la familia sean significativamente más elevadas que lo reportado en familias control (**Lenane et al., 1990; Riddle et al., 1990; Lewis et al., 1935; Bellodi, 1992**). En cambio, Black et al. (1992) reportaron un estudio en familias de treinta y dos probandos TOC junto con treinta y tres individuos normales, comprobando, así pues, que este trastorno presenta agregación familiar.

Además, otro hallazgo reportado a partir de los estudios en familia de probandos con TOC, es la alta prevalencia de trastornos que presentan tics, apoyando la hipótesis de que hay una relación etiológica entre el TOC y el trastorno Gilles de la Tourette (**Leonard et al. 1992**).

Los estudios mencionados proporcionan evidencia puntual que sugiere la presencia de un componente genético en la manifestación del padecimiento (**Pauls, 1995**).

2.3.2.- Estudios en gemelos.

Los estudios en gemelos han sido de gran importancia histórica en el desarrollo de la Genética Epidemiológica; esto se debe principalmente a que estos estudios proporcionan un experimento natural que aloja un resultado directo para diferenciar causas debidas a un componente genético y a las producidas por factores ambientales (**Kim, 2006**).

El diseño de un estudio en gemelos se considera a los gemelos idénticos (monocigóticos, MZ) o gemelos fraternos (dicigóticos, DZ). Esta metodología analiza la concordancia entre ambos, tal que cuando los dos comparten el rasgo de interés se dice que son concordantes; y cuando solo un miembro es afectado por la enfermedad, se dice que son discordantes para el rasgo en estudio. Los gemelos monocigóticos comparten el 100% del contenido genético y los gemelos dicigóticos, al crearse por fertilización separada, comparten el 50% del bagaje genético. Al ser la concordancia al trastorno mayor en MZ que en DZ, se demuestra una gran contribución genética en el trastorno (**Kim, 2006; Smoller, 2008**).

En 1986, Rasmussen y Tsuang en una revisión de los estudios en gemelos TOC publicados hasta esa fecha muestran que treinta y dos de cincuenta y un gemelos (no

confirmados para cigocidad) y trece de veinte gemelos monocigotos confirmados, eran concordantes para TOC. Sin embargo, no se puede establecer la medida en que contribuyen los factores genéticos en este trastorno al no ser posible la comparación de la correspondencia entre gemelos monocigotos y dicigotos. Estudios subsecuentes muestran tasas de diferencia en la concordancia de hasta 40% entre MZ y DZ, indicando nuevamente que hay un componente genético involucrado en el TOC (**Andrews, 1990**).

En un estudio de revisión más reciente, los autores reportan que los síntomas TOC son heredables, con una influencia genética entre 45 y 65% en niños, y en adultos del 27 al 47% (**van Grootheest et al. 2005**).

En general, los estudios con gemelos reportan tasas de concordancia del 53 al 87% para gemelos monocigotos y del 22 al 47% en gemelos dicigotos, evidenciando de esta manera la existencia de factores genéticos para el desarrollo del TOC (**Pauls, 1995**).

2.3.3.- Estudios en adopción.

Otro medio para diferenciar la contribución genética y la del ambiente en el desarrollo de un trastorno son los estudios en adopción. El método consiste en establecer las concordancias diagnósticas entre los probandos adoptados y sus padres, tanto biológicos como adoptivos.

Los estudios en adopción se valen del análisis de niños adoptados en edad temprana, por lo que comparten una relación genética con los padres biológicos y factores ambientales con los padres adoptivos. A través de ellos, se puede determinar la relación biológica y ambiental en el desarrollo de un trastorno. Es decir, si los genes contribuyen en el riesgo a desarrollar la enfermedad, el hijo adoptado presentará la enfermedad; y si los factores ambientales son importantes en la susceptibilidad de la enfermedad, la enfermedad se manifestará en el hijo adoptivo y, quizá, en los padres no biológicos (**Smoller, 2008**).

Este tipo de metodología aporta información importante sobre las causas genéticas y ambientales en la gestión de una enfermedad; sin embargo no existen estudios de adopción reportados hasta la fecha en pacientes con TOC.

2.4.- Estudios de segregación.

Una vez que la agregación familiar fue establecida mediante estudios epidemiológicos (en familia y gemelos, en este caso), lo siguiente es determinar si los patrones de segregación

dentro de las familias son consistentes con modelos genéticos. El análisis de segregación monitorea la transmisión de la enfermedad de una generación a otra, confirmando la presencia de factores genéticos e indicando el modo de herencia **(Kim, 2006)**.

Nicolini et al. reportaron en 1991 un análisis de segregación en los datos recolectados de veinticuatro familias TOC para examinar si los patrones de transmisión son consistentes con un modelo de herencia Mendeliano. En sus resultados, no obstante, no pudieron distinguir si los modelos eran autosómico dominante o recesivo. El modelo dominante fue estadísticamente compatible con la presencia de un gen de efecto principal.

Nestadt et al. en el año 2000 reportaron en su artículo que encontraron tres grandes hallazgos. Primero, que el TOC es familiar; en familiares de primer grado de probandos TOC se manifiesta cerca de cinco veces mayor prevalencia a lo largo de su vida. Segundo, que las obsesiones son más afines al aspecto familiar del trastorno, que las compulsiones. Tercero, que la edad temprana de desarrollo del TOC apuntala un subgrupo familiar. La relación entre edades tempranas de desarrollo y familiaridad de las condiciones médicas está bien documentada y ya ha sido reportada en otros estudios de TOC. Esta asociación fue especialmente significativa en este estudio, pues encontraron una mayor segregación en familiares de probando con edad de inicio temprano. Se concluye que esta condición posee un origen genético **(Nestadt et al., 2000)**.

Aunque estos estudios sugieren un posible modelo dominante, el modo de transmisión es complejo. Esto quizá se deba al hecho de que el TOC es una condición etiológicamente y clínicamente heterogénea; diversos genes pueden estar involucrados en el desarrollo del TOC. Un modelo de herencia complejo parece describir el modo de transmisión del TOC **(Kim, 2006)**.

Pauls (2008) menciona que estos estudios confirman la transmisión del TOC en familias. Esto sugiere que el modelo es complejo, dada la heterogeneidad observada y la variabilidad de las características clínicas observadas en las familias. Los estudios a la fecha sugieren que hay algunos genes de efecto principal, importantes para la manifestación del TOC **(Pauls, 2008)**.

2.5.- Análisis de ligamiento.

Estos estudios se enfocan en la búsqueda de regiones dentro de los cromosomas que se encuentran asociados con la enfermedad. Se han reportado cuatro estudios de ligamiento en el TOC **(Hanna et al. 2002; Shugart et al. 2006; Willour et al. 2004; Zhang et al. 2002)**. Hanna

y sus colegas en el 2002 reportan en un tamizaje amplio del genoma de cincuenta y seis individuos provenientes de siete familias, la presencia de ligamiento genético con marcadores en los cromosomas 9p y 19q. Willour et al. (2004) replicaron los resultados de Hanna y compañía con respecto al cromosoma 9p24. Zhang et al. (2002) encontrando, así, ligamiento en tres cromosomas (4q, 5q, 17q). Finalmente, un estudio más reciente (**Shugart et al., 2006**) sugiere como loci susceptibles los cromosomas: 1q, 3q, 6q, 7q y 15q. De tal manera, todas estas regiones que han mostrado presencia de ligamiento son candidatas para buscar los genes de susceptibilidad al TOC, mediante los estudios de asociación.

2.6.- Estudios de asociación genética.

Los estudios de asociación genética identifican un alelo determinado de un marcador, un genotipo específico, o un haplotipo que está estadísticamente asociado con individuos afectados, e comparación con los controles. Dos estrategias son empleadas para los estudios de asociación: estudio en población de caso-control y estudios basados en familia.

Actualmente, la mejor aproximación usada para identificar genes de susceptibilidad al TOC es comparar la distribución de genotipos o alelos de genes implicados en la neurofisiología del TOC, utilizando estos dos tipos de estudio (**Kim, 2006**).

2.6.1.- Estudios de asociación de caso-control.

En estos estudios se comparan dos grupos de personas: aquellas que presenten la enfermedad o la condición que se quiere estudiar (casos) y el otro grupo compuesto por individuos que no padecen la enfermedad en estudio (controles). De tal manera, al analizar un gen candidato, lo que se espera es que el grupo de casos presente una mayor frecuencia del alelo de riesgo comparado con el grupo control, demostrando que el gen en estudio participa en el desarrollo de la enfermedad.

Una equiparación inapropiada de casos y controles ocasiona un sesgo de selección si la frecuencia alélica difiere entre los grupos de casos y el de controles. Esto viene a ser la estratificación poblacional, que ocurre cuando la población de estudio consiste en una mezcla de sub-poblaciones discretas que difieren en la frecuencia alélica. Se debe evitar que el muestreo de casos-controles reclute muestras de sub-poblaciones heterogéneas, pues provoca diferencias en la frecuencia del gen entre casos y controles y causa resultados falsos.

La selección de sujetos control debe cumplir los principales requisitos para obtener una inferencia significativa en los estudios epidemiológicos de casos y controles, en este caso, el grupo control son los sujetos dentro de la familia que no presenta la enfermedad en estudio (**Balding, 2007**).

2.6.2.- Estudios de asociación basados en familias.

Estos estudios son una útil herramienta para el estudio de enfermedades complejas como el TOC ya que evita problemas de estratificación poblacional, entre otros factores. Buscan asociación entre marcadores genéticos y enfermedades, siendo las familias la unidad de muestreo y consisten en los padres y el sujeto afectado (tríos). Otro atractivo de los estudios de asociación basados en familia se debe a que detectan la presencia del ligamiento, es decir identifica marcadores que se transmiten con la enfermedad, apoyando que el fenotipo es heredado y, por tanto, detectable en familias. Estos estudios consisten en el análisis de la transmisión de alelos de los padres al sujeto afectado y son comparados con aquellos no heredados, por lo que los controles definidos a partir de la misma familia (alelos no transmitidos), evita el problema de la estratificación poblacional.

Existen dos métodos de asociación basados en familias: el TDT y el HRR. La prueba de desequilibrio de ligamiento (TDT) es el método más utilizado, porque es una prueba de ligamiento y asociación (**Balding, 2007**). Esta prueba reporta cuando existe un ligamiento entre el marcador genético y la enfermedad. Las dos metodologías proponen como hipótesis la presencia de un alelo de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, por lo que se cuantifica las veces que es transmitido el alelo de riesgo de los padres al hijo afectado. En el método de TDT, sólo considera a los padres heterocigotos siendo de esta forma una metodología más informativa que el método de riesgo relativo por haplotipo (HRR), en el cual se incluye tanto a los padres homocigotos como a los heterocigotos (**Smoller, 2008**).

La principal desventaja de los estudios basados en familias viene de lo impráctico que resulta el reclutamiento de los familiares y su costo. Familiares adecuados para el estudio pueden no estar disponibles, en particular en enfermedades con una edad de inicio tardía (muertos, desaparecidos, etc.). Los controles familiares provocan mayores costos de genotipificación comparado a controles no relacionados (**Balding, 2007**).

2.6.3.- Estudios genéticos del TOC.

Más de 60 estudios de genes candidatos han sido reportados en la última década. Muchos de estos estudios han examinado genes de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico como potenciales marcadores candidatos involucrados en la manifestación del TOC.

Los resultados han sido diversos, con algunos estudios sugiriendo una asociación genética entre el TOC y genes de estos dos sistemas y otros estudios han fallado en replicar dichos hallazgos. Los genes candidato para estudios de asociación se han enfocado en estos sistemas, principalmente basado en el conocimiento de la fisiopatología y farmacología del TOC (**Pauls, 2008**).

Los sistemas opioide, neuropeptídico y varios sistemas de neurotransmisores como dopaminérgico, serotoninérgico y glutamatérgico y sus enzimas asociadas han sido implicados en la fisiopatología del TOC. De particular interés resulta el serotoninérgico debido a la eficacia de los ISRS contra este trastorno, considerándose a los genes de este sistema como marcadores candidatos en su estudio. Pruebas de asociación con polimorfismos localizados en el gen del transportar de serotonina (SLC6A4), y genes que codifican a los receptores 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C, y 5-HT1B han reportado resultados positivos con el TOC; sin embargo otros han sido negativos.

Hay estudios recientes que buscan clarificar el papel del sistema serotoninérgico en una muestra de pacientes TOC, controles de pacientes psiquiátricos sin TOC y controles saludables, todos de origen español caucásico. En este estudio se analizaron variantes genéticas del SLC6A4 (STin2, VNTR y 5-HTTLPR) y del HTR2A A-1438G, (rs: 6311) y T102C (rs: 6313), asociadas con la susceptibilidad para padecer TOC.

Sus resultados replican los hallazgos previos y proporcionan evidencia de la asociación entre el polimorfismo STin2 VNTR (polimorfismo de repeticiones en tándem del intrón 2 del transportador de serotonina SLC6A4) y TOC. Dada la funcionalidad de dicho polimorfismo y a su asociación con el TOC, puede ser una variante de susceptibilidad para TOC. Por otro lado, no hay datos analizando el desequilibrio de ligamiento entre el STin2 VNTR y el polimorfismo trialélico 5-HTTLPR. Sin embargo, la existencia de desequilibrio de ligamiento entre STin2 VNTR y el bialélico 5-HTTLPR, hace posible creer que el STin2 VNTR esté en desequilibrio de ligamiento con el 5-HTTLPR trialélico, ocasionando la asociación entre STin2 VNTR y TOC. Sin embargo, la verdadera relevancia de esta asociación requiere mayor investigación, aumentando el tamaño de la muestra para obtener un mayor poder estadístico, incluyendo su

posible asociación con los severidad de los síntomas del TOC (**Saiz, 2008**). Este estudio deja en claro la necesidad de continuar nuestra investigación de varios polimorfismos con muestras grandes y rasgos clínicos más homogéneos.

Los genes del sistema dopaminérgico más estudiados en el TOC son los del transportador de dopamina DAT1, y de los receptores DRD2, DRD3 y DRD4. Los genes de enzimas relacionadas al sistema dopaminérgico que se han estudiado en el TOC son dos: el gen de la catecol-o-metiltransferasa (COMT) y de la monoamino oxidasa A (MAO-A). El alelo de baja actividad de la MAO-A fue asociado con los pacientes TOC femeninos (**Camarena et al., 1998; 2001**). Asimismo, se reportó que el alelo de la MAO-A de alta actividad y el de baja actividad de la COMT fueron asociados al TOC en pacientes varones (**Karayiorgou et al., 1999**). Los genes relacionados a glutamato que se estudian en el TOC son GRIK, GRIN2B y SLC1A1. Otros genes relacionados al TOC que se han estudiado son los genes relacionados a la materia blanca OLIG2 y MOG.

Se ha propuesto un modelo murino para el estudio del TOC. Este modelo se crea al inactivar al gen *SAPAP3* (*DLGAP3*), involucrado en la transducción de la señal de glutamato dentro del ganglio basal. Al inactivar dicho gen, los ratones presentaban el rasgo obsesivo-compulsivo de acicalamiento y una mayor ansiedad; estas conductas se ven revertidas al administrar un ISRS. Esta reversión también se presenta mediante la expresión selectiva del gen *SAPAP3* en el estriado (**Smoller, 2008**).

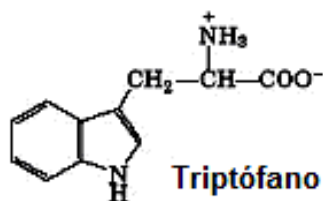
Dada la complejidad del fenotipo del TOC, es probable que varios genes tengan un efecto fundamental en la manifestación del trastorno. Los agentes terapéuticos actuales parecen tener una mayor influencia en los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos, pues estos genes son importantes para que en un futuro se puedan desarrollar tratamientos efectivos, y que implicaría que los genes pudieran estar involucrado en la etiología del TOC (**Pauls, 2008; Smoller, 2008**).

3.- El sistema serotoninérgico.

El L-triptófano es un aminoácido esencial debido a que no es sintetizado por los mamíferos o que no se sintetiza en cantidades suficientes para satisfacer la demanda fisiológica (pero se encuentra en muchas proteínas), que se debe proporcionar en la dieta (**Kaplan, 2003**). A la serotonina se le considera como una de las hormonas pineales, ya que la produce la glándula pineal, junto con la melatonina (**Ganong, 2004**).

Se hace mención en diversos estudios que se requiere una dieta adecuada (factor ambiental) para un funcionamiento óptimo del sistema serotoninérgico (**Kaplan, 2003**). A continuación en la figura 3 se muestra la estructura del triptófano.

Figura 3: La estructura química del triptófano.

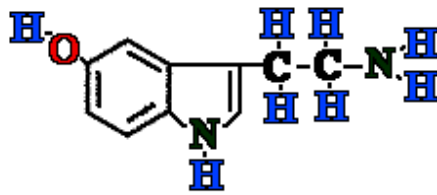


(**Lehninger, 2004**)

La cantidad de triptófano consumido por el cerebro no sólo depende de la cantidad de triptófano en la sangre, sino también en la cantidad de aminoácidos que compiten con el triptófano para su recaptura en el SNC (**Dykstra, 1992**).

La serotonina es un alcaloide simple que se relaciona química y estructuralmente con el L- triptófano (**Paquette, 2004**). Fisiológicamente, la serotonina (neurotransmisor monoamínico) es de los muchos productos naturales conocidos en animales y plantas que contienen un anillo de indol como parte de su estructura (**Ganong, 2004**). La serotonina es producto de la transformación metabólica del triptófano. Desempeña un papel importante en los procesos mentales humanos. Cuando se alteran los niveles de concentración de la serotonina en el cerebro, ya sea química o físicamente, se observan perturbaciones mentales como, por ejemplo, el TOC (**Mycek, 2000**). En la figura 4 se muestra la estructura de la serotonina.

Figura 4: La estructura química de la serotonina.



Serotonina (5-Hidroxitriptamina)

La Psicofarmacología reporta que la serotonina está distribuida a lo largo de todo el cuerpo humano y sólo una pequeña porción del total existente en el cuerpo se encuentra en el cerebro (**Dykstra, 1992; Champe, 2004**). La serotonina es sintetizada y almacenada en varios sitios del cuerpo (plaquetas, tubo digestivo, etc.). La mayor concentración almacenada de serotonina se encuentra en la mucosa intestinal. Cantidades menores se almacenan en las plaquetas y en el sistema nervioso central. Este neurotransmisor tiene el efecto de hacer perceptible el dolor, provocando la percepción de algún daño en el tracto digestivo (**Champe, 2004**). Otros textos dicen que la serotonina alcanza su mayor concentración en las plaquetas y en el tubo digestivo, donde se encuentra en las células enterocromafines y en el plexo mientérico (**Báez, 1978**). Existen menores cantidades en el cerebro y la retina. Se atribuye que la serotonina regula del sueño, al igual que a los trastornos afectivos (**Champe, 2004**).

La serotonina contiene numerosas clases y subclases de receptores acoplados a proteína G. Ésta es de tipo rhodopsina A, el cual se piensa que está conformado por siete hélices transmembranales: tres asas intracelulares, tres asas extracelulares, seguido por una hélice amino terminal extracelular y una hélice carbonilo terminal intracelular. Funcionalmente, las regiones transmembranales extracelulares sirven para unirse al ligando (serotonina) y para desencadenar la cascada de señalización en las regiones transmembranales intracelulares. El número de receptores para serotonina clonados y caracterizados aumenta con rapidez. En la actualidad se conocen siete receptores serotoninérgicos, 5-HT₁₋₇. Dentro del grupo 5-HT₁ se encuentran los subtipos A, B, D, E y F. En el grupo 5-HT₂ están los tipos A, B y C (antes llamado 5-HT_{1C}).

Existen dos subtipos de 5-HT₅, A y B. La mayoría de estos receptores se une con las proteínas G e influye en la adenilciclase o en la fosfolipasa C. Los receptores 5-HT₃ son canales iónicos. Algunos receptores para serotonina son presinápticos y otros postsinápticos.

Los receptores 5-HT_{2A} median la agregación plaquetaria y la contracción del músculo liso. Los receptores 5-HT₄, 5-HT₆, y 5-HT₇ son cerebrales y se distribuyen en todo el sistema

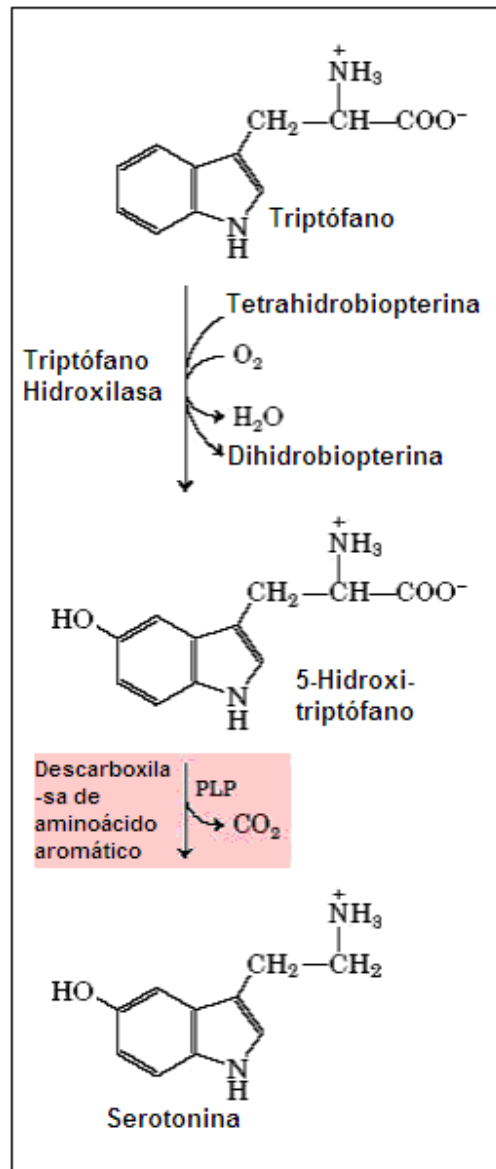
límbico y los receptores 5-HT₆ tienen una gran afinidad por los fármacos antidepresivos (**Ganong, 2004**).

En el sistema serotoninérgico existen diversas rutas a lo largo del sistema nervioso central. Éstas se originan en el núcleo de Raphe, en la región media del pons y de la región superior de tallo cerebral (cerca de la línea media y la región de Raphe del pons Varolio y tallo cerebral superior). Células neuronales del 5-HT han sido agrupadas y clasificadas como B1 al B9. Los grupos que yacen más cercanamente al tallo cerebral (B4-B9) inervan los altos centros (cerebelo, neocortex, tálamo y el sistema límbico). Los núcleos serotoninérgicos más caudales están colocados a lo largo de los centros bajos del sistema nervioso central, la médula y la columna vertebral (**Greenstein, 2000; Dykstra, 1992**). Existen núcleos de serotonina localizados en el cerebro que se proyectan desde la parte posterior hasta la porción inferior del tallo cerebral. En esta zona, la acción primaria de la serotonina es inhibitoria, causada por un incremento en la conductancia del ión K⁺ (**Dykstra, 1992**).

3.1.- Metabolismo de la serotonina.

El metabolismo de la serotonina consta de dos pasos: el triptófano se convierte a 5-hidroxitriptófano por acción de la triptófano hidroxilasa y posteriormente una descarboxilación dependiente de PLP (piridoxal fosfato, coenzima de la vitamina B6, necesaria para que funcione la descarboxilasa de aminoácido aromático) produce la serotonina (ver figura 5). El PLP es el grupo prostético de las aminotransferasas y su papel fundamental es el metabolismo de moléculas con grupos funcionales amino (**Lehninger, 2004**).

Figura 5: Ruta metabólica para la síntesis de serotonina a partir del triptófano.



Adaptada de Lehninger, 2004

En el cuerpo (salvo el cerebro), la serotonina se forma por la hidroxilación y descarboxilación del aminoácido esencial triptófano. En condiciones normales, la hidroxilasa no se satura; la ingesta más abundante de triptófano en la dieta puede aumentar el contenido cerebral de serotonina. Debido a que la serotonina no puede pasar la barrera hematoencefálica, esta se sintetiza *de-novo* dentro del sistema nervioso central (SNC) (**Dykstra, 1992**).

Todos los aminoácidos pueden entrar al cerebro, pero el transporte se regula de tal forma que ingresa primero la tirosina (precursor de la dopamina y norepinefrina) y luego el triptófano.

Para internar el triptófano al cerebro, se requiere glucosa, pues la secreción de la insulina pancreática permite la circulación de los aminoácidos, para que, así, el triptófano pueda internarse en el cerebro y favorecer la producción de serotonina (*Rinzler, 2006*). Ya dentro de este órgano, el triptófano es convertido a 5-hidroxitriptófano.

Las enzimas tirosina cinasa (enzima precursora de la dopamina y norepinefrina) y la triptófano hidroxilasa son enzimas que limitan la velocidad de la reacción de los neurotransmisores, su inhibición puede influenciar drásticamente los niveles de dopamina, norepinefrina y serotonina en el cerebro. Un fármaco que inhibe la triptófano hidroxilasa es el p-clorofenilalalina (PCPA) y dicha inhibición es de efecto duradero, por lo que requiere un nuevo abastecimiento de aminoácidos para sintetizar nuevamente a la enzima. A los animales que se les administra PCPA no duermen, indicando también la importancia del sistema serotoninérgico en procesos del sueño y en trastornos del sueño (*Dykstra, 1992*).

Para la eliminación de la serotonina se cuenta con la enzima monoamino oxidasa (MAO) que se encuentra en tejidos neuronal y hepático, entre otros. En la neurona, esta enzima funciona como una “válvula de seguridad” para desaminar (oxidando e inactivando) cualquier exceso de moléculas neurotransmisoras que se puedan fugar de las vesículas sinápticas cuando la neurona está en descanso.

Posterior a la liberación de serotonina de las neuronas serotoninérgicas, gran parte se recupera por un mecanismo de recaptación activa, mediante la proteína transportadora de serotonina. La función de esta última es la de transportar la serotonina del espacio sináptico al interior de la neurona presináptica. Esta proteína finiquita su efecto en el espacio extracelular de la serotonina y la almacena en el interior de la neurona sináptica. Interesantemente, esta misma proteína es el blanco de los ISRS.

La enzima MAO desactiva la serotonina para formar el ácido hidroxindolacético (AHIA). Esta sustancia es el principal metabolito urinario de la serotonina y su cantidad en orina se utiliza como índice del ritmo metabólico de la serotonina en el cuerpo. En la glándula pineal, la serotonina se convierte en melatonina (*Ganong, 2004*).

3.2.- El sistema serotoninérgico y las enfermedades mentales.

Ciertos antidepresivos bloquean la recaptura de serotonina, así pues, este mecanismo se relaciona además con la terapia de este padecimiento. Lo llamativo es que los antidepresivos tienen un efecto terapéutico hasta después de varias semanas (**Dykstra, 1992**).

Los ISRS pueden tratar muchos padecimientos, debido a varias posibilidades. Una es que hay varios subtipos de receptores de serotonina (15 subtipos a la fecha) que regulan selectivamente los circuitos neuronales que se asocian a un comportamiento particular. En la Tabla 3, se ejemplifican los diversos fenotipos que ocurren al realizar un “knockout” a los receptores.

Tabla 3: Fenotipos asociados a “knockout” a los receptores de serotonina en ratón.

Receptores de serotonina y el circuito neural de la conducta.		
<u>Receptor inhabilitado</u>	<u>Fenotipo conductual</u>	<u>Circuito neural propuesto debido al fenotipo</u>
Receptor 5-HT1A	Incremento en la conducta ansiosa	Pérdida de receptor 5-HT1A en el hipocampo durante el desarrollo Pérdida de autoreceptores 5-HT1A y liberación desmedida de serotonina
Receptor 5-HT1B	Disminución en el movimiento en hembras	Pérdida de autoreceptor terminales 5-HT1B y liberación desmedida de serotonina
Receptor 5-HT2C	Aumento en el consumo de alimento	Alteración en el circuito alimentario del hipotálamo Desinhibición de rutas centrales de dopamina
Receptor 5-HT3A	Condicionamiento aumentado para el miedo	Pérdida de receptor inhibitorio 5-HT3A gabaérgico en la amígdala lateral

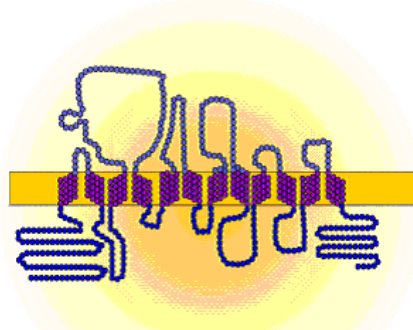
Adaptado de Roth, 2006

De acuerdo a esta tabla, alteraciones en la actividad de diferentes receptores de serotonina, o alteraciones en la actividad de subpoblaciones de cualquier receptor, pueden perturbar distintos circuitos neuronales y, por tanto, contribuir a la manifestación de comportamientos característicos de una enfermedad psiquiátrica específica (**Roth, 2006**).

3.3.- El gen del transportador de serotonina SLC6A4.

El gen humano que codifica a la proteína transportadora de serotonina (ver figura 6) se le denomina SLC6A4. También es conocido como el gen 5-HTT y SERT. El gen SLC6A4 se encuentra localizado en el cromosoma 17q11.2 y contiene 14 exones. El promotor de dicho gen (ver figura 7) se define como una caja TATA con varios sitios de unión para factores de transcripción (AP1, AP2 y SP1). La región del promotor contiene una secuencia rica en GC, en donde se localiza una región VNTR que consta de un fragmento de 20-23 pb -que van de los repetidos I al XVI- (ver figura 8) (**Heils et al., 1996**). Los repetidos son secuencias de pares de bases que difieren ligeramente en la secuencia de sus pares de bases. El sitio de unión de los factores de transcripción AP1, SP1 y AP2 (ver figura 10) están localizados en la región promotora del gen y su función es la activación o represión de la expresión genética. El factor de transcripción AP2 modula la activación genética en presencia de AMPc y ante ésteres de forbol (**Latchman, 2004**).

Figura 6: Se muestra una ilustración de la proteína transportadora de serotonina.



El transportador de serotonina humano.

(<http://www.bio.davidson.edu/courses/GENOMICS/2004/Cobain/angergene.html>)

Se han descrito diversos polimorfismos contenidos en este gen, pero el más estudiado es el localizado en la región promotora y al que se le denomina 5-HTTLPR (*5-hydroxytryptamine transporter linked polymorphic region*). Éste es un polimorfismo del tipo inserción/delección de 44 pb, situada entre los repetidos VI y VIII (ver figura 8) (**Heils et al., 1996**). El polimorfismo se caracteriza por ser un sistema dialélico, en el que la inserción es denominada como la variante larga (*Large, L*) y la delección como corta (*Short, S*). Utilizando los oligonucleótidos descritos por Heils et al. (1996) es posible identificar el alelo largo con un tamaño de 528 pb, y el corto con un tamaño de 484 pb.

Figura 7: Gen SLC6A4 desglosando al polimorfismo 5-HTTLPR.

SECUENCIA DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DEL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA

Oligonucleótido

```
1      tctcccgcct ggcggtgccg ctctgaatgc cagcacctaa cccctaatgt cctactgca
61     gccctccage atccccctg caactctcca gcaactcctt gtaccctctc taggctcgt Corte
121    ctgcatecc cctattatcc ccccttccc cctegggca tccccctgc accccagca MspI
181    tccccctgc agcccccca gcatctccc tgcacccca gcatccccc tgcagccct
241    ccagatccc cctgcacccc cagatcccc cctgcagccc cccagatc tcccctgca
301    cccagatc ccccctgag ccttccage atccccctgc acctctcca ggatctccc
361    tgaaccccc attatcccc ctgcaccct cgcagtatc cccctgcac cccagatc
421    cccccatga cccccgcat cccccctga cccctccage attctcttg caccctacca
481    gtatccccc gatcccgge etccaagct cccgcccacc ttgggtccc cgcctggcg
541    tctaggtgga accagaatc cgcgggact ccaccctgt ggagctgccc tctcttccc
601    gtggtgtcc agctcagtc ctc tagacgc tcag
```

Oligonucleótido

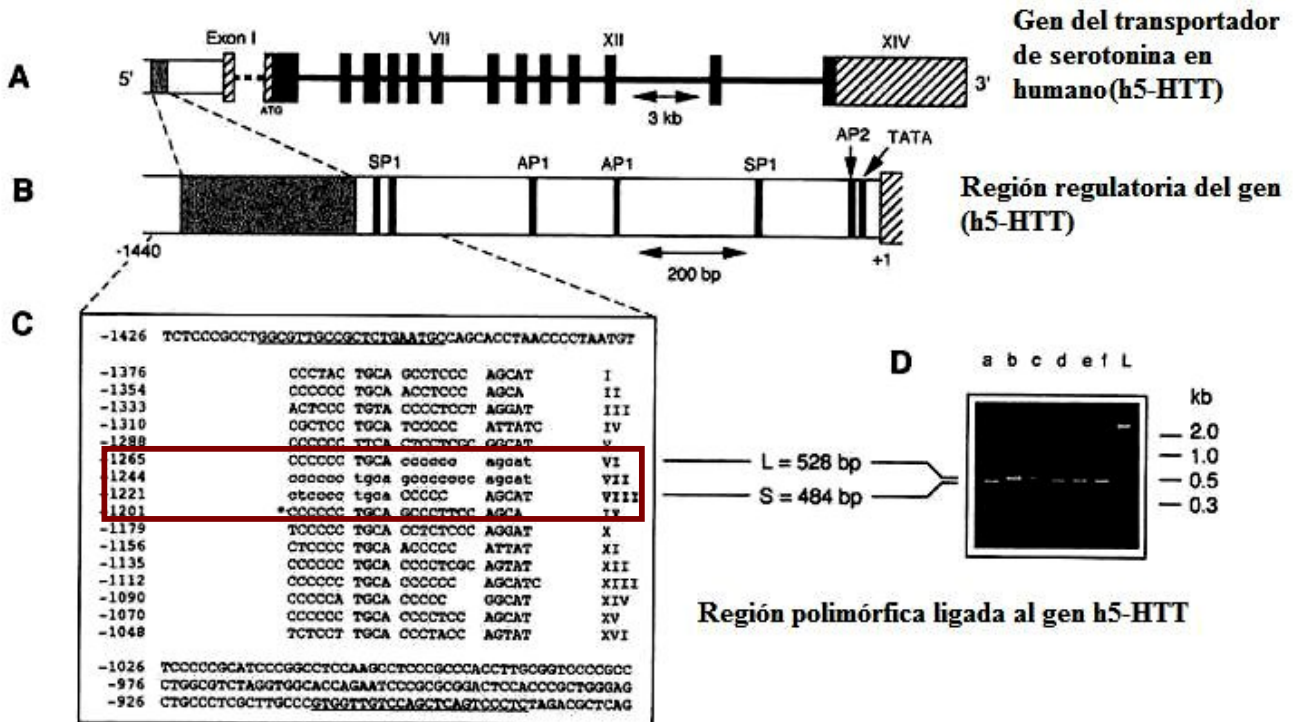
PRIMERS

INSERCIÓN/DELECIÓN (44pb)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=2130993>)

Los oligonucleótidos enmarcados en los dos recuadros es la secuencia descrita por Heils et al., y son usados para la genotipificación.

Figura 8: Esquema de la localización del polimorfismo 5-HTTLPR.



Adaptado de Hiels, 1996

A la variante del alelo S se le asocia con una baja expresión y funcionalidad del transportador de serotonina (5-HTT), mientras que la variante L se reportó con un incremento de los niveles de la expresión de hasta tres veces respecto al estado basal. Estos resultados fueron realizados mediante estudios de transfección en las que se introducen construcciones con los alelos S y L, en los que se mide la actividad transcripcional del gen (**Smeraldi et al., 2006**).

Un equipo de investigadores secuenciaron esta región y encontraron que los repetidos eran imperfectos, es decir, que variaban en la secuencia de las bases, simbolizándolas con letras del alfabeto griego y cuyas combinaciones definían 10 diferentes haplotipos. El repetido 14 lo podemos encontrar con sus variantes A al D, siendo el más frecuente el 14A que corresponde al alelo S. Por ejemplo, las variantes 14A y 14 D difieren en el sexto repetido y el 14B difiere de la 14D en el repetido 7 (ver figura 8). Los alelos de 16 repetidos (A → F) difieren el uno del otro en el sexto, séptimo y octavo repetido, siendo el 16A la variante más frecuente (**Nakamura et al., 2000**).

Figura 9: Nomenclatura de Nakamura para el polimorfismo 5-HTTLPR.

(a)	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	η	θ	ι	κ	λ	μ	ν	ξ	14 A		
	α	β	γ	δ	ϵ	μ	\omicron	θ	ι	κ	λ	μ	ν	ξ	14 B		
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	η	θ	ι	κ	λ	μ	ν	ξ	14 C		
	α	β	γ	δ	ϵ	μ	η	θ	ι	κ	λ	μ	ν	ξ	14 D		
(b)	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	\omicron	ζ	η	θ	ι	κ	λ	μ	ν	ξ	16 A
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	η	θ	η	θ	ι	κ	λ	μ	ν	ξ	16 B
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	η	ζ	η	θ	ι	κ	λ	μ	ν	ξ	16 C
	α	β	γ	δ	ϵ	μ	\omicron	ζ	η	θ	ι	κ	λ	μ	ν	ξ	16 D
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	\omicron	σ	η	θ	ι	κ	λ	μ	ν	ξ	16 E
	α	β	γ	δ	ϵ	τ	\omicron	ζ	η	θ	ι	κ	λ	μ	ν	ξ	16 F

(Nakamura et al., 2000)

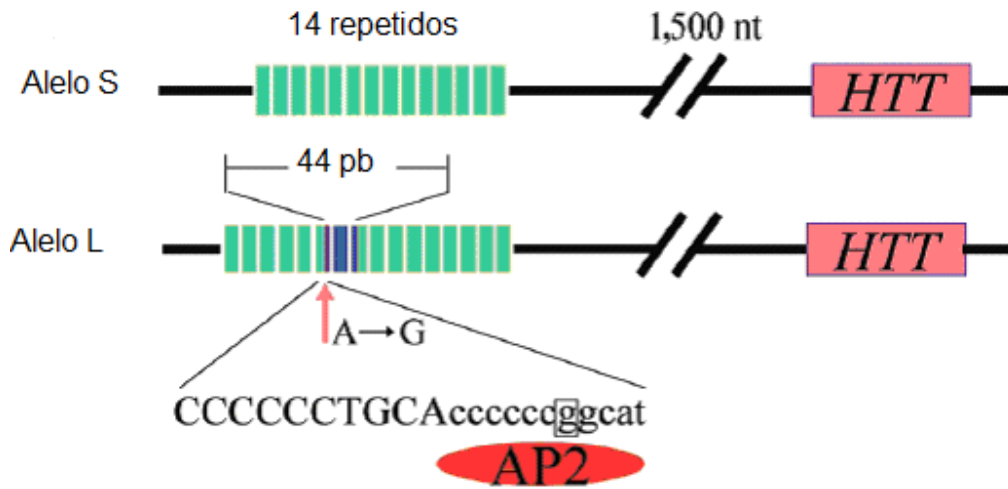
En el inciso a) de la figura 9 se muestra la diversidad del alelo S y en el inciso b) se muestra la diversidad del alelo L, todos ordenados acorde al alfabeto griego en orden de frecuencia.

Recientemente, fue identificado un polimorfismo definido por el cambio de Guanina/Adenina localizado dentro del alelo L (sexto repetido del 5-HTTLPR), estableciéndolo como un sistema trialélico definiendo a los alelos L_A , L_G y S (Smeraldi et al., 2006).

Estudios de transfección en líneas celulares han reportado que el alelo L_A se asocia con altos niveles de expresión de 5-HTT in vitro y al L_G se le asocia a bajos niveles de expresión de 5-HTT, similar al alelo S. Lo anterior es debido a que la presencia de G crea un sitio de unión del factor de transcripción AP2, actuando como un represor de la expresión genética. Mientras que la presencia de una A (alelo L_A) evita la unión de AP2 y por lo tanto no se relaciona con la represión de la expresión genética, característica también observada con el alelo S (Hu, 2006).

Al trabajar con polimorfismos de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés), se les codifica con un número de referencia que se llama rs (referent SNP ID), de tal manera que dicho polimorfismo es denominado como rs25531, definiendo al sistema trialélico (ver figura 10) (Praschak-Rieder, 2007).

Figura 10: Esquema de los alelos de la sustitución A→G polimorfismo rs25551.



Adaptado de Hu, 2006

El método utilizado para identificar este polimorfismo, es mediante el uso de la enzima de restricción *MspI*, que digiere al alelo L definiendo a los alelos en fragmentos de acuerdo a la tabla 4:

Tabla 4: Patrón de bandas del polimorfismo 5-HTTLPR utilizando la enzima *MspI*.

	L _A L _A	L _A L _G	L _G L _G
Variables	339 pb	339 pb	
		174 pb 165 pb	174 pb 165 pb
Constantes	128 pb 62 pb	128 pb 62 pb	128 pb 62 pb

Comunicación personal Praschak-Rieder, 2007

La enzima *MspI* corta la secuencia de pares de bases 5' C/CGG 3'. Al realizar la digestión con dicha enzima, el tamaño de los fragmentos de los oligonucleótidos varía debido a que reconoce y corta diversos fragmentos que varían dentro del amplicón. Los cortes (tabla 4) definen secuencias de bases que son variables y que definen a los diferentes genotipos y otras constantes y presentes en todos los genotipos (**Praschak-Rieder, 2007**).

3.4.- Estudios de 5-HTTLPR en TOC.

Camarena et al. estudiaron el sistema dialélico del 5-HTTLPR en población mexicana, pero no se encontró una asociación entre dicho polimorfismo y el TOC. Sus resultados no mostraron una asociación positiva, tal vez a causa de la estratificación de población, pues ya se sabe que la frecuencia alélica puede variar entre distintas poblaciones. Este estudio se analizó con el método de TDT (métodos para estudios basados en familia) que evita problemas de estratificación poblacional. Se analizó una muestra de 43 tríos para buscar una asociación entre dicho gene y el TOC. El TDT confirmó la presencia de no asociación entre el polimorfismo del TOC y 5-HTTLPR. El análisis de desequilibrio de ligamiento (TDT) no mostró una preferencia en la transmisión del alelo L.

En este estudio, se le relaciona más el alelo L que el S con el TOC debido a que una mayor frecuencia de pacientes eran portadores del alelo L, al igual que en otros dos estudios, aunque no fue verdaderamente significativo dicho hallazgo (**Camarena et al., 2001**).

Se ha reportado una variante rara, el polimorfismo denominado Ile425Val, y la reportaron asociada al TOC (**Ozaki et. al., 2003**). Otros estudios se han enfocado en el 5-HTTLPR en la región promotora SLC6A4. Un estudio en familia encontró asociación significativa con TOC, pero otros estudios basados en familia no reportaron los mismos hallazgos. Un estudio reciente muestra una asociación significativa del TOC con el sistema trialélico. Es importante mencionar que este estudio también replica la asociación de la variante larga del 5-HTTLPR asociada al TOC (**Dickel, 2007**).

Se reportó un meta-análisis (**Lin, 2007**) recopilando los estudios individuales reportados entre el polimorfismo del gene transportador de serotonina y el TOC. En este caso, este tipo de metodología nos sirve como una analítica poderosa para analizar datos acumulativos de estudios individuales con un tamaño de muestra pequeña y con bajo poder estadístico. Este autor comenta en su meta-análisis que la estratificación de la población es un importante sesgo en estudios de asociación, especialmente en los estudios realizados usando diseños basados en población y esto debe ser evitado en futuros estudios.

Se concluye en este estudio que existe una asociación significativa entre el alelo S del polimorfismo 5-HTTLPR y el TOC. Esta conclusión, sin embargo, resulta aún prematura debido a la heterogeneidad en la metodología utilizada por los diferentes estudios. Además, el polimorfismo puede jugar un papel más preponderante en algunos rasgos clínicos o en

subgrupos con TOC. Las nuevas variantes emergentes en el sistema trialélico del 5-HTTLPR necesitan ser analizadas en subsecuentes estudios de asociación (**Lin, 2007**).

En otro estudio del 2006, se sugiere que el genotipo homocigoto SS no es necesariamente la causa única en el desarrollo del TOC, pero puede ser uno de varios genes que contribuyan al TOC, debido a que el alelo corto no es causa suficiente para desarrollar este padecimiento al encontrarse individuos con este genotipo que no presentan TOC, aunque sean una minoría. Este efecto contributivo puede ocurrir dentro de un modelo multigénico que conlleve a padecer TOC (**Pérez, 2006**).

4.- Diseño Experimental.

4.1.- Planteamiento.

Hasta ahora existe mucha controversia respecto al papel del gen SLC6A4 en el desarrollo del TOC. De tal manera, resulta interesante analizarlo en una población mexicana utilizando un método de asociación basado en familias tipo tríos.

4.2.- Hipótesis.

H_a: El alelo de riesgo S del polimorfismo 5-HTTLPR se transmite con mayor frecuencia en familias con el TOC.

H₀: No se demuestra un modelo genético preferencial de transmisión en familias con el TOC.

4.3.- Objetivos generales y específicos.

1. Analizar el polimorfismo 5-HTTLPR del gen SLC6A4 en familias con TOC.
2. Conocer la frecuencia de los alelos S y L en población mexicana.

4.4.- Metodología.

4.4.1.- Descripción de la muestra.

Criterios de inclusión:

- Que el paciente cumpliera los criterios del Manual de Diagnóstico DSM-IV respecto al diagnóstico del TOC.
- Que el paciente fuese mexicano y/o de origen mexicano, donde los padres y los abuelos del mismo, debiesen ser de nacionalidad mexicana.
- Un consentimiento informado por escrito en el que el paciente (probando) y sus familiares (preferentemente cercanos como padres y hermanos) consientan participar en el estudio mediante la extracción de sangre periférica de las venas (aproximadamente 5 ml de sangre).

- Se incluyeron familias tipo tríos (probando, padre y madre).
- Un grupo adicional de probandos que cumplieran los criterios diagnósticos del DSM-IV para el TOC.
- Un grupo de sujetos control, es decir individuos que no presentaban la enfermedad.

Extracción del ADN.

Todo el material utilizado para la extracción de ADN fue esterilizado con vapor húmedo en el autoclave (121°C, 15-20 psi, 20 min) para asegurar que no existan trazas de enzimas indeseadas como las ARNasas o ADNasas. Las soluciones utilizadas fueron filtradas por un sistema de vacío con ayuda de membrana Millipore de 0.20 µm ó de 0.45 µm. Finalmente, las soluciones son esterilizadas en la mismas condiciones. Toda el agua utilizada para hacer las soluciones fue desionizada mediante el sistema MilliQ de Millipore. En el *capítulo 9.2* viene descrito como se preparan las soluciones utilizadas en el laboratorio.

Una vez extraída del paciente y de los familiares, la sangre fue colocada en tubos con EDTA como anticoagulante (tubos Vacutainer de tapón morado), donde se agitaron ligeramente en un agitador de sangre. Más adelante se referirá la razón por la que se utilizó este anticoagulante en específico.

El método de extracción de ADN de la sangre periférica se realizó acorde al método de Lahiri y Nurnberger modificado con cloroformo/fenol (**Lahiri et al., 1991**). Las soluciones utilizadas se mencionan en el *capítulo 9.2* anexo a esta tesis. Se requiere que la muestra de sangre esté a temperatura ambiente para la extracción del ADN. De los tubos Vacutainer con EDTA, la sangre se transfirió a los tubos de centrifuga Falcon de 50 mL y se rotuló dicho tubo.

4.4.2.- Extracción del ADN a partir de sangre periférica.

El protocolo utilizado es una modificación realizada en este laboratorio al método propuesto por Lahiri y Nurnberger en 1991 para la extracción de ADN de la sangre periférica.

La modificación consistió en utilizar los tres disolventes orgánicos descritos (fenol, cloroformo, alcohol isoamílico). Con esta metodología, Lahiri reporta que se extrae entre 130-160 µg de ADN por cada 5 mL de sangre entera. Dicho método se divide en dos fases.

Para comenzar la primera fase de este método, se colocó 5 mL de la sangre a temperatura ambiente contenida en un tubo Falcon para centrifuga y se esperó que se

descongelara la muestra sanguínea. Luego, se aforó a 20 mL el Tubo Falcón con la solución TKM-1, la cual es una solución de lisis con Tris, potasio y magnesio requerida para lisar a los glóbulos rojos (eritrocitos), siendo los glóbulos blancos (leucocitos) los que resistan a dicha solución. Luego, se adicionó 5 μ L de Nonidet-P40, que es un detergente (tensoactivo) no iónico destinado a disminuir la tensión superficial de la solución y que permite que se hidrate mejor la solución. Se centrifugaron las muestras a 1100 rpm por 15 minutos en una centrifuga.

Una vez centrifugadas, con una pipeta de transferencia se descartó el sobrenadante a un recipiente de residuos peligrosos bioinfecciosos (recipiente rojo para RPBI), cuidando no transferir el sedimento color marrón oscuro. Luego, se aforó el tubo con la solución TKM-1 a 20 mL. y se resuspendió el sedimento. Después, se centrifugó la muestra a 900 rpm por 10 minutos.

Nuevamente, con una pipeta de transferencia se descartó el sobrenadante a un recipiente de residuos peligrosos bioinfecciosos (recipiente rojo para RPBI).

A los tubos Falcón conteniendo el sedimento color marrón claro se le adicionó 10 μ L de proteinasa K (5 μ g/ μ L) previamente descongelada, inmediatamente después, se adicionó 25 μ L de SDS al 20 % y se agregó 800 μ L de la solución TKM-2 (solución que contiene EDTA para activar a la proteinasa K). El TKM-2 es la solución acuosa adecuada para realizar la digestión.

Finalmente, se incubaron los tubos Falcón a 37°C en baño María entre 20-24 horas. Al término de esta incubación concluye la fase 1.

La segunda fase comenzó al día siguiente. Primero, se sacaron los tubos Falcon de la incubadora y se transfirió 1 mL del producto digerido a dos tubos Eppendorf de 2 mL, previamente esterilizados y rotulados. Después, se añadió a cada tubo 1 mL de fenol equilibrado, se agitó la muestra y se centrifugó el tubo a 12500 rpm por 2 minutos en la microcentrifuga (**Gross, 1973**).

El sobrenadante se transfirió con una pipeta de transferencia a otro tubo Eppendorf de 2 mL y se descartó el tubo previo que contiene al fenol. El fenol sirvió para disolver y remover las proteínas de la fase acuosa. Después, a dicho sobrenadante se le añadió 500 μ L de fenol y 500 μ L de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), para disolver los ácidos grasos de la fase acuosa. Se agitó el tubo y se volvió a centrifugar el tubo a 12500 rpm por 2 minutos en la microcentrifuga.

El sobrenadante se transfirió con una pipeta de transferencia a otro tubo Eppendorf de 2 mL y se le añadió 1 mL de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se homogenizó y se volvió a centrifugar a 12500 rpm por 2 minutos en la microcentrifuga. Nótese que este

procesamiento con disolventes orgánicos fue para remover proteínas y ácidos grasos de la muestra.

Se transfirió el sobrenadante de ambos tubos Eppendorf a un tubo de cultivo. Ya recolectados los sobrenadantes en el tubo, se le añadió 2 mL de etanol absoluto (para precipitar al ADN) a -20°C . El etanol disminuye el coeficiente dieléctrico y permite que se precipite el ADN.

La cantidad de la hebra de ADN genómico precipitado fue calificado mediante cruces siguiendo el siguiente esquema:

XXXX----- a la muestra que tenga mucho más de cuatro hebras de ADN

XXX -----a la muestra que tenga de dos hasta tres hebras de ADN

XX -----a la muestra que tenga una hebra de ADN

X-----a la muestra que no se le distinga una hebra de ADN

Una vez registrado, se transfirió la cantidad de ADN de la muestra a un tubo de almacenaje decantando al etanol absoluto y se centrifugó a 12500 rpm por 2 minutos en la microcentrífuga. Se descartó el resto de la fase acuosa del tubo de cultivo. A las muestras que no se les distinguió alguna hebra de ADN, se centrifugó toda la fase acuosa.

Ya precipitado el ADN, se le adicionó al tubo de almacenaje 1 mL de etanol al 70% a -20°C y se resuspendió el sedimento. Esto se hizo para lavar la muestra. Se volvió a centrifugar a 12500 rpm por 2 minutos en la microcentrífuga y se descartó el sobrenadante de etanol al 70 % y con una micropipeta se quitó todo el etanol sin despegar el sedimento. El sedimento de ADN se le centrifugó al vacío por aproximadamente 10 minutos hasta secar el sedimento (liofilizado). En estado liofilizado el ADN se conserva mejor que estando en solución. Ya liofilizado el ADN, se tapó el tubo y se guardó en el refrigerador.

4.4.3.- Cuantificación de ADN.

De acuerdo a la cantidad de ADN obtenida, se le agregaron diferentes volúmenes de una solución TE (Tris HCl 10 mM con 1 mM EDTA ambos a pH 8.0) de acuerdo a la siguiente escala:

XXXX-----100 μ l de TE

XXX-----75 μ l de TE

XX-----50 μ l de TE

X-----30 μ l de TE

Se desprendió el ADN sedimentado agregando el volumen correspondiente de TE al tubo de cultivo, se disolvió la muestra y se obtuvo una solución homogénea empleando el vórtex. Una vez homogenizada, la muestra de ADN se transfirió a tubos Eppendorf de 0.6 mL donde se colocaron 4 μ L de la muestra y 96 μ L de TE dando un volumen final de 100 μ L. Esto se hizo por duplicado para cada muestra para asegurar que el valor sea repetible.

Se agitaron las muestras 5 segundos en el vórtex y se centrifugaron las muestras para concentrar su volumen. Se calibró el espectrofotómetro adecuadamente, colocando la opción dsDNA (ADN de doble hebra) y configurando el factor de dilución en la pantalla correspondiente.

Se hizo lectura al blanco (previamente colocando en la celda limpia 100 μ L de TE cuidando que la celda estuviera limpia, que no tuviera burbujas y se colocó dicha celda de la forma adecuada para que el haz la atravesara correctamente).

Se revisó que el aparato marcara cero de absorbancia y se hizo la lectura de las muestras cambiando la punta de la micropipeta por cada muestra.

Se anotó para cada muestra los valores de absorbancia a 260 nm. de longitud de onda, ya que a esta longitud absorbe el ADN, también se registró para la absorbancia a 280 nm., longitud de onda en que absorben las proteínas, se sacó la relación A_{260}/A_{280} (que debe ser alrededor 1.8 para asegurar una buena calidad en la extracción de ADN) y se anotó la concentración que exhibió la pantalla del espectrofotómetro en μ g/mL.

Factor programado en el espectro $1 A_{260} = 50.0 \mu\text{g ADN/mL}$

Para calcular la cantidad de ADN y, así, ajustar el volumen final de dilución, se realizó lo siguiente:

- Se le sacó el promedio a las dos repeticiones de la muestra [μ g/mL], esto para que el valor sea representativo y corrobora, a su vez, que no varíe mucho la lectura.
- Se transformó dicho valor a [μ g/ μ L] (se divide entre 1000 en el análisis dimensional).

- Se multiplicó el valor de $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por el valor de TE (V_i) en que se dejó la muestra en la extracción del ADN. Esto nos da un valor de μg de ADN total final.

Si el valor de $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fue 0.5 o mayor, se multiplicó la cantidad de ADN total por el factor de conversión 2, lo cual nos da un volumen final (V_f) en μL . El volumen inicial es con el que se partió la cuantificación.

Restar $V_f - V_i = \text{Volumen a agregar en } \mu\text{L a la muestra para ajustar la muestra a la concentración de } [0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}]$.

Dicha concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se utiliza para guardar el stock cuantificado de la muestra. Ya para trabajar la muestra, se utilizó a una concentración de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Una vez cuantificada la muestra de ADN a la concentración final de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, se realizó el genotipo del sistema bialélico mediante la técnica de PCR normal y una electroforesis revelada con bromuro de etidio (para el sistema bialélico). La otra variación es una PCR para amplificar, luego realizar una digestión con enzimas de restricción a las muestras correspondientes con alelo L (para el caso del sistema trialélico) acoplado a una electroforesis con gel de agarosa revelado con bromuro de etidio.

Otro procedimiento similar de la Biología Molecular para realizar la genotipificación del sistema bialélico y el trialélico es mediante la técnica de RT-PCR (PCR en tiempo real).

4.4.4.- Análisis del 5-HTTLPR.

Para realizar el análisis, se realizó una PCR y una electroforesis con gel de agarosa y una tinción con bromuro de etidio revelado con un transiluminador de rayos U.V. La técnica de PCR, se estandarizó el procedimiento en el laboratorio de la siguiente forma:

“Protocolo 5-HTTLPR”.

Oligonucleótidos sentido 5' GGC GTT GCC GCT CTG AAT GC 3' (20pb) 10mM

Antisentido 5' GAG GGA CTG AGC TGG ACA ACA C 3' (22pb) 10mM

Preparación de los dNTPs con 7-deaza-2'-deoxi-guanosina-5'-trifosfato.

dATP 10 mM 30 μ L (Concentración final 2 mM)
dCTP 10 mM 30 μ L (Concentración final 2 mM)
dTTP 10 mM 30 μ L (Concentración final 2 mM)
dGTP 10 mM 15 μ L (Concentración final 1 mM)
7 deaza dGTP 10 mM 15 μ L (Concentración final 1 mM)
H₂O PCR 30 μ L

Volumen total = 150 μ L

Al poderse comprar diversas marcas de Taq polimerasas, se proponen dos protocolos validados en el laboratorio para la enzima de "TaqGold" (de Roche que requiere activación) y para la "DryTaq" (de GeneChoice que no requiere activación) utilizando los mismos oligonucleótidos descritos por Heils (**Heils et al., 1996**).

Preparación de la mezcla maestra con enzima TaqGold.

Buffer PCR (10x) 1.5 μ L concentración final 1x
MgCl₂ 25 mM 0.9 μ L concentración final 1.5 μ M
dNTPs con 7 deaza dGTP 1.5 μ L concentración final 200 μ M
Oligonucleótido sentido 0.375 μ L concentración final 0.25 μ M
Oligonucleótido antisentido 0.375 μ L concentración final 0.25 μ M
Thermus aquaticus polimerasa Gold Roche (5U/ μ L) 0.2 μ L concentración final 1 unidad
H₂O PCR 8.15 μ L

Volumen total para cada muestra = 13 μ L

ADN (50 ng/ μ L) = 2 μ L

Volumen final = 15 μ L

Preparación de la mezcla maestra utilizando la enzima Gene choice Dry Taq

Buffer PCR estándar (10x) 1.5 μ L concentración final 1x
dNTPs con 7 deaza dGTP 1.5 μ L concentración final 200 μ M

Oligonucleótido sentido 0.375 μ L concentración final 0.25 μ M

Oligonucleótido antisentido 0.375 μ L concentración final 0.25 μ M

Thermus aquaticus polimerasa Genechoice (5U/ μ L) 0.2 μ L concentración final 1 unidad

H₂O PCR 9.05 μ L

Volumen total para cada muestra = 13 μ L

ADN (50 ng/ μ L) = 2 μ L

Volumen final = 15 μ L

Nota: El buffer ya contenía el cloruro de magnesio en el caso de la enzima Gene Choice. Hasta al final se le añade la Taq polimerasa a la mezcla.

La 7 deaza dGTP, sirvió para que se acoplen mejor los oligonucleótidos. Favorece que se separen mejor los 3 puentes de hidrógeno característicos de la unión G-C. Estos protocolos no requieren el uso del DMSO (que sirve de astringente para darle mayor especificidad a la enzima y pueda realizar la PCR).

La PCR se realizó con la Taq polimerasa marca Dry Taq en un termociclador con el siguiente protocolo: 2 minutos de desnaturalización a 95 °C, 40 ciclos de calentado a 95°C/30 seg, enfriando a 62°C/30 seg y calentando a 72°C/1 min, seguida por el paso final para realizar la extensión (elongación) a 72°C/5 min y la muestra se queda refrigerada en el termociclador a 4°C.

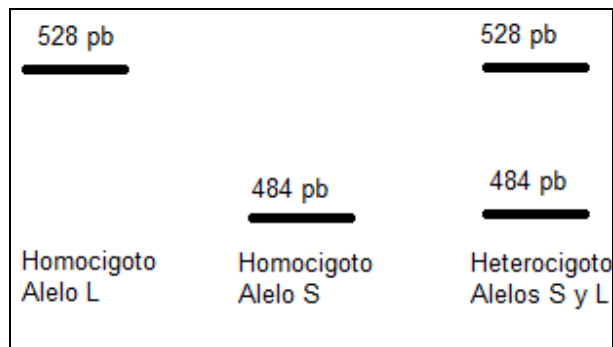
Los alelos que se buscaron en el genotipo son dos: el S y el L en el gel de agarosa grado biotecnología high melt / small fragment marca: "Biological Molecular Reagents", el cual es una mezcla de agarosa ultra pura, con una óptima resolución de 10-1000 pb. El rango de dicho gel es de 34-38 °C y un rango de fusión de 85-89°C.

El gel de agarosa se preparó a una concentración de 1.5% con la solución TBE 1x (ver apéndice, *capítulo 9.2*) y se corrió la muestra a 90 voltios entre 1.5 a 2 horas. La cámara de electroforesis se llenó con TBE 1x a la marca de aforo provista en la misma.

De la muestra recién amplificada se tomaron 7 μ L y se mezcló con 3 μ L del tinte para electroforesis. Para preparar la escalera molecular, se tomaron 4 μ L de la escalera Step Ladder de 50 pb de Sigma, se mezcló con 3 μ L del tinte para electroforesis y se añadió 3 μ L de agua PCR. Finalmente, se cargaron todas las muestras a los pozos del gel.

El gel se visualizó al UV mediante una tinción con bromuro de etidio, donde se dejó reposar en la solución (0.5 μ g/mL) por 10-15 minutos (según se haya teñido) (Figura 11).

Figura 11: Patrón de bandas para el sistema bialélico.



4.4.5.- Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó la ecuación de Hardy-Weinberg y el programa estadístico F-BAT. La ley de Hardy-Weinberg (H-W) establece que en una población grande, azarosa y que está en constante reproducción, se espera que la frecuencia de alelos y genotipos no cambien estabilizándose después de una generación. El principio de Hardy-Weinberg aplica a cualquier tipo de alelo que es heredado acorde a las leyes Mendelianas (**Russell, 2006**).

Una población donde la frecuencia alélica para un locus determinado es predecible, se dice que está en equilibrio con la Ley de Hardy-Weinberg. En un sistema bialélico, la proporción relativa de las 3 combinaciones son: p^2 (dos alelos a), $2pq$ (un alelo a y uno b), q^2 (dos alelos b). Al ser estos los tres genotipos posibles, se establece que:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1.$$

La resolución de la ecuación nos dará la frecuencia de alelos esperados en la población estudiada (p y q). La forma estadística de establecer la presencia del equilibrio de Hardy-Weinberg es mediante la prueba de Chi cuadrada, mediante tablas de contingencia de 2×3 en donde se analiza el número de individuos que presentan las tres combinaciones (alelos observados) con los alelos esperados. El valor estadístico con una $p \leq 0.05$ nos dice que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

La frecuencia alélica puede ser calculada de la siguiente manera: Se cuentan el número de alelos de cada cromosoma y se divide por el número total de cromosomas analizados. A este se le conoce como “frecuencias alélicas”. Su fórmula matemática es:

Frecuencia de alelo = # de copias de un alelo dado / sumatoria de la cuenta de todos los alelos en la población (Russell, 2006).

Para el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó un programa llamado HWE, de J. Ott (1988).

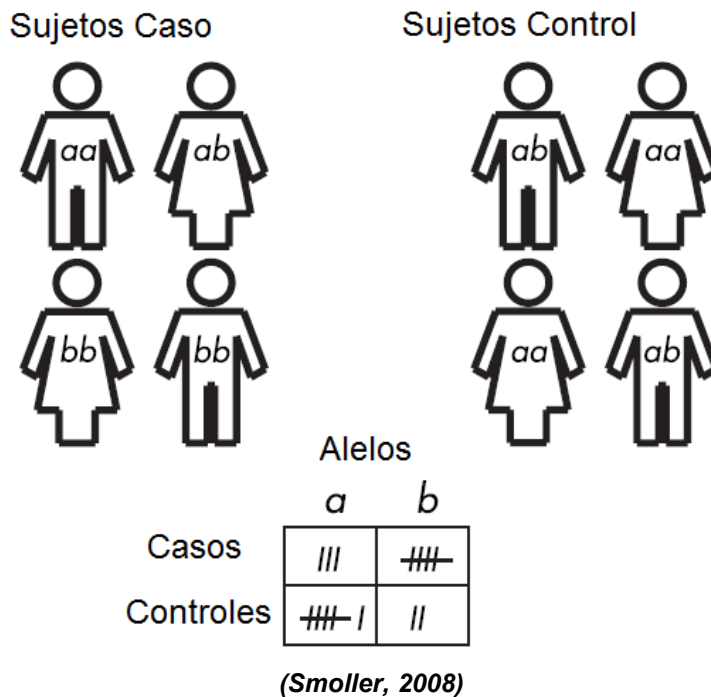
La frecuencia de genotipos se calcula en un sistema bialélico, mediante el conteo de individuos portadores de las tres posibles combinaciones (homocigotos al alelo *a*, heterocigotos *ab* y homocigotos al *b*). El total de cada combinación se divide entre el número de individuos analizados en la población. La sumatoria del total de las tres deberá ser el número de la muestra analizada, expresándose este valor en porcentajes.

4.4.6.- Análisis de casos y controles.

En un estudio de asociación de casos y controles, el número de cada tipo de alelos de un gen en un grupo de sujetos afectados (casos) son contabilizados y comparados con la distribución alélica (frecuencia alélica) del grupo control (sujetos saludables). De tal manera que si la frecuencia de uno de los alelos es mayor a la observada en los controles, se dice que existe una asociación genética asociada a la enfermedad (**Smoller, 2008**).

Se requiere que los casos y controles no sean emparentados pero sí que formen parte de la misma población de estudio. Una prueba estadística simple es utilizada para determinar si la distribución alélica observada en el grupo de casos es distinta a la distribución observada en el grupo control. Una diferencia en la distribución es evidencia para establecer una asociación genética con el trastorno, donde el alelo sobre-expresado en el grupo de casos es considerado como un alelo de riesgo. En la figura 12 se observa que el alelo *b* es el alelo de riesgo (**Smoller, 2008**). Aunque varios métodos tienen la desventaja de producir un sesgo en la selección y la falta de marcos de muestreo adecuados para los controles la ventaja de aparear casos con controles es que es más sencillo asegurar que los casos y controles seleccionados dentro de un estrato son representativos de la muestra en estudio (**Balding, 2007**).

Figura 12: Representación de un estudio de asociación de casos y controles.



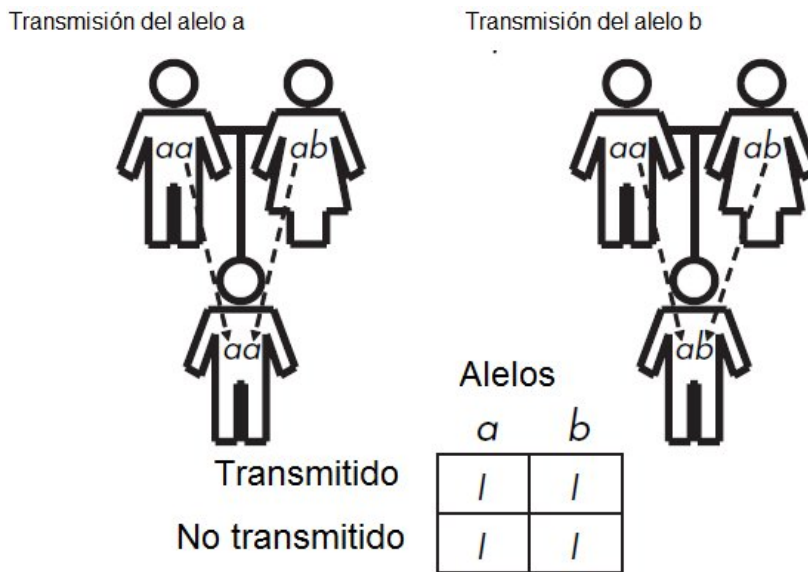
4.4.7.- Análisis por FBAT.

La prueba de desequilibrio de la transmisión es una metodología muy utilizada para analizar la asociación genética en familias, con el propósito de identificar alelos de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en estudio.

El TDT (*Transmission Disequilibrium Test*), en su forma original, considera la transmisión de la variante alélica de un marcador bialélico de padres heterocigotos al hijo afectado. El TDT trata al alelo no transmitido como un marcador control al alelo transmitido, de tal manera que solo los padres heterocigotos son informativos. La hipótesis nula es que los padres heterocigotos pueden transmitir los dos alelos con la misma probabilidad. El FBAT (*Family Based Association Tests*) acorde a la literatura es una variante de la prueba de desequilibrio de la transmisión o TDT (**Balding, 2007**).

Lo atractivo de esta metodología yace en su simplicidad y cercana relación a pruebas estadísticas comunes, así como una absoluta protección a la estratificación poblacional. Al TDT se le considera como una prueba de asociación y una prueba de ligamento. Por estos atributos, el TDT se ha convertido en un método muy popular que ha dado luz a diversas y nuevas extensiones de la misma.

Figura: 13: Representación de un estudio de asociación basados en familia.



(Smoller, 2008)

La figura 13 muestra la forma en que se lleva a cabo el análisis de la transmisión de alelos. Como podemos observar, solo en el caso de los padres heterocigotos se puede establecer claramente la forma del alelo que es transmitido al probando afectado. Este procedimiento es aplicado a cada una de las familias incluidas en el estudio, de tal manera que si al final encontramos una mayor transmisión de una variante alélica, concluiremos que el gen en estudio se encuentra asociado con la enfermedad en estudio.

Aunque el TDT es utilizado frecuentemente como una prueba de asociación, primero fue propuesta como una prueba de ligamiento. Esto se vio motivado por estudios del gen de la insulina en diabetes mellitus tipo 1, que había mostrado asociación poblacional en estudios de genes candidatos, pero con poca evidencia para ligamiento en parejas de hermanos. Por lo tanto, la presencia de la asociación fue establecida y el TDT fue capaz de demostrar que la asociación coincidía con el ligamiento, en lugar de deberse a estratificación poblacional. Esta aplicación se ha mantenido útil para estudios de genes candidatos (**Balding, 2007**).

En la página del Departamento de Bioestadística de Harvard, se puede descargar el programa FBAT, al igual que una reseña y un instructivo. Del programa estadístico FBAT se menciona que consiste en una serie de pruebas ajustadas a poblaciones heterogéneas. Este programa tiene muchas virtudes como son:

- Ofrece asociaciones bi y multialélicas, usando los modelos genéticos habituales (aditivo, dominante y recesivo).
- Usa datos de familias nucleares, siblings (hermanos), tríos o cualquier combinación.
- Provee pruebas sin sesgos, con o sin el genotipo fundador.
- Estima frecuencias alélicas; corrobora que haya consistencia Mendeliana.

(<http://biosun1.harvard.edu/~fbat/fbat.htm>)

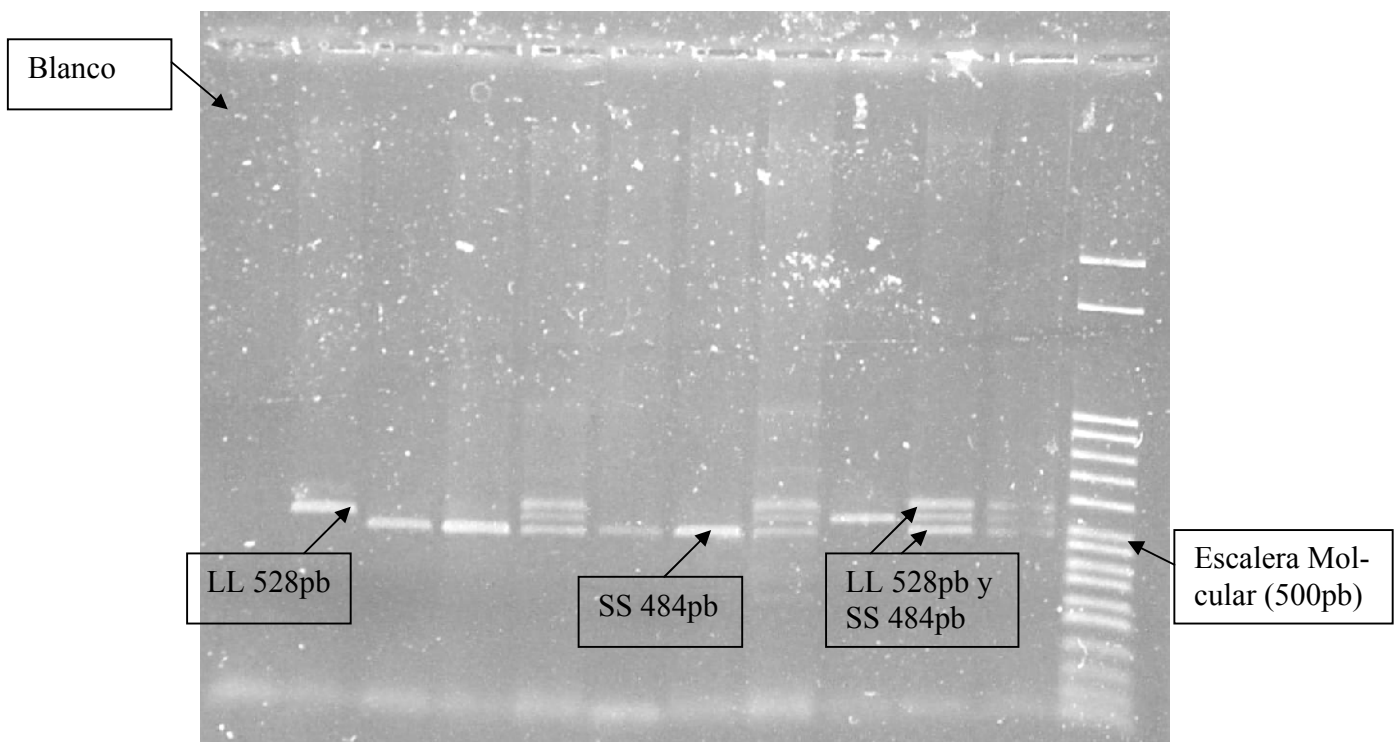
5.- Resultados.

Se analizaron cincuenta y siete familias nucleares para el estudio del polimorfismo bialélico 5-HTTLPR mediante la metodología de asociación basada en familias. Además, se llevó a cabo un análisis adicional en el que se comparó las frecuencias alélicas de probandos y sujetos controles (96 probandos y 151 controles).

El número final de muestras genotipificadas en este estudio consistió en 247 personas. El número final del estudio de familias consistió en 236 personas, con 88 familias agrupadas en 57 familias nucleares. La figura 14 muestra una foto de la genotipificación del sistema bialélico del 5-HTTLPR.

Las frecuencias de los genotipos del 5-HTTLPR fueron distribuidas acorde al equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0.019$, $gl=1$, $p=0.8913$).

Figura 14: Fotografía del gel mostrando el sistema bialélico revelado en bromuro de etidio mediante rayos U.V.



Los resultados del análisis de casos y controles reporta que no existe asociación en la muestra estudiada entre los casos (pacientes TOC) respecto a los controles (pacientes sanos). Esta

ausencia de asociación en el análisis se aplica también analizando la muestra de casos vs padres y padres vs controles (Tabla 5).

Tabla 5: Frecuencias alélicas de las muestra estudiada.

	Genotipos			Alelos (%)		
	n= (%)	SS	SL	LL	S	L
Padres	148	47 (0.32)	74 (0.5)	27 (0.18)	168 (0.57)	128 (0.43)
Probandos	96	33 (0.34)	44 (0.46)	19 (0.2)	110 (0.57)	82 (0.43)
Controles	151	48 (0.32)	75 (0.50)	28 (0.19)	171 (0.57)	131 (0.43)

Probandos vs. Controles: $X^2=0.3471$, gl=2, p=0.3741

$X^2=0.0214$, gl=1, p=0.8784

Probandos vs. Padres: $X^2=0.4048$, gl=2, p=0.8188

$X^2=0.0136$, gl=1, p= 0.9031

Padres vs. Controles: $X^2=0.005$, gl=2, p=0.9974

$X^2=0.0011$, gl=1, p=0.9722

Finalmente, el análisis mediante FBAT de las familias genotipadas no mostró la transmisión de un alelo de riesgo asociada al TOC (Tabla 6).

Tabla 6: Análisis de la transmisión de alelos por FBAT del polimorfismo 5-HTTLPR.

Marcador	Alelo	REC.	Familias	S-E(S)	Var (S)	Z	P
5-HTTLPR	S	0.531	45	3.500	15.750	0.882	0.377822
5-HTTLPR	L	0.469	45	-3.500	15.750	-0.882	0.377822

6.- *Discusión.*

En el estudio de las enfermedades complejas, existen dificultades en cuanto a la reproducibilidad de los hallazgos, ya que por ejemplo, se han hecho estudios preliminares acerca del TOC asociado al polimorfismo del 5-HTTLPR y dichos estudios discrepan en que unos mencionan una asociación del TOC con el genotipo SS, otros lo asocian al genotipo LS y no reconocen vínculo alguno con el genotipo LL. Cuando se hicieron estos estudios se desconocía que hubiera un sistema trialélico, sólo era vigente el sistema bialélico. Lo interesante es que el alelo S se asocia al TOC acorde a un meta-análisis realizado recientemente (**Lin, 2007**).

El presente estudio del gen del transportador de serotonina y el TOC en población mexicana no encuentra asociación estadísticamente significativa al analizarlo mediante las dos metodologías de asociación, esto es, casos-controles y basados en familias. Estos resultados replican los hallazgos reportados por otros grupos de investigación en población caucásica, asiática y latinoamericana.

Podría pensarse en ampliar la muestra de las familias, para tener un mayor poder estadístico, sin embargo esto requeriría muchos años ya que los pacientes no se pueden identificar sino hasta que llegue a consulta al Instituto Nacional de Psiquiatría. Esta dificultad operativa complica notoriamente la ampliación de la muestra. Además, el programa estadístico FBAT descarta el estudio de las familias con padres homocigotos en la muestra de estudio, pues no sirve para el análisis de transmisión del alelo.

Además, la estratificación poblacional es un sesgo importante en estos estudios de asociación, principalmente en aquellos que se realizaron utilizando diseños basados en población. Aunque nuestro estudio implicó un método que evita este tipo de problemática, como lo es los estudios basados en familias, se requieren estudios diseñados con un tamaño de muestra mayor para validar los resultados del meta-análisis (**Lin, 2007**).

Se sugiere en el ámbito internacional que este tipo de estudios se realicen en el futuro por haplotipos o por el análisis de interacción con otros genes y de otras regiones de un gen. Como por ejemplo, el estudio realizado por Saiz et al. (2008) quienes encontraron asociación entre el polimorfismo VNTR STin2 del gen SLC6A4 y el TOC. Además, este grupo reporta que existe un desequilibrio de enlace entre el polimorfismo VNTR STin2 y el sistema trialélico del 5-HTTLPR, reportando que sí existe asociación con el TOC (**Saiz, 2008**).

Todos los estudios de asociación reportados del TOC respecto al 5-HTTLPR hay diferencias en criterios de inclusión para su estudio y, dado que la naturaleza del TOC es heterogénea en su presentación clínica, curso clínico y en su respuesta al tratamiento, se requiere que en un futuro esto sea tomado en consideración.

Todos los aspectos mencionados en esta discusión pueden ser áreas de oportunidades en su conjunto como criterios de inclusión para futuros estudios genético del TOC. Lo que se puede buscar son otros fenotipos o subtipos del TOC definidos en base a características clínicas, que den una mayor homogeneidad a la muestra en estudio y obtener, así, estudios más reproducibles y confiables.

Además, se propone que lo más adecuado para realizar nuevos estudios del TOC sea mediante análisis de interacción con otros genes, considerando los nuevos polimorfismos presentes en el 5-HTTLPR, o la interacción con las variantes genéticas del SLC6A4 (STin2, VNTR y rs: 25530), HTR2A (A-1438G, (rs: 6311) T102C (rs: 6313) y considerar otros genes candidatos.

En su nivel más básico, el progreso en la investigación genómica debe llevar a un mejoramiento importante en la comprensión de la neurobiología de las enfermedades psiquiátricas, lo que pavimentará el camino para un cambio en el énfasis desde la estructura del genoma hasta la proteómica funcional (esto es, el estudio de las proteínas en su nivel funcional).

Los avances de la Genética Psiquiátrica traerán consigo importantes implicaciones para la farmacoterapia. Es probable que identificando los genes involucrados en la patogénesis de un trastorno psiquiátrico; se descubrirán nuevos objetivos, lo cual dará lugar a fármacos “hechos a la medida” que sean relevantes en el desarrollo tanto del efecto terapéutico, como de los efectos secundarios (**DiLalla, 2004**).

Los investigadores del estudio genético del TOC han identificado que se presentan limitaciones que deberán superarse. Primero, el TOC no es una condición homogénea, por lo que pueden existir varios mecanismos etiológicos. Por lo tanto, la habilidad de definir genéticamente subgrupos válidos de TOC es crucial para estudios genéticos del TOC (**Kim, 2006**). Estas estrategias pueden ser:

1. Aproximaciones categóricas (fenotipo del TOC de edad de inicio temprano), es decir, considerar diversos mecanismos etiológicos como criterio de inclusión.

2. La aproximación de la dimensión (de los síntomas TOC, endofenotipos). En este caso, se refiere a utilizar escalas validadas en población mexicana para cuantificar la severidad de los síntomas TOC.

Otro problema presente es que la distribución genética, pues en la muestra estudiada se contienen individuos de distintas etnias. Lo recomendable es realizar estudios a gran escala, con poblaciones étnicamente homogéneas (*Kim, 2006*).

El estado limitado del conocimiento sobre el curso de la fisiopatología y redes de genes interactuando en TOC y los resultados obtenidos en estudios de ligamiento y de asociación sugieren que es prematuro limitar el enfoque sobre la asociación del TOC con genes candidatos específicos. Al contrario, hay que realizar estudios de asociación multigenéticas de una muestra lo suficientemente grande para identificar las regiones genómicas conteniendo los genes candidatos prometedores de efecto modesto que pueda ser probado rigurosamente en subsecuentes estudios.

Tales estudios podrían identificar regiones del genoma que tienen alta probabilidad de albergar genes que aumenten el riesgo de desarrollar TOC. Es claro que a partir de la literatura existente que, al igual que otros padecimientos médicos, el TOC es etiológicamente heterogéneo. Dada esta similitud en la etiología heterogénea, es importante empezar con una muestra lo suficientemente grande de individuos para que subgrupos clínicos homogéneos tengan una mayor semejanza genética etiológica para poder identificarse. Será imperativo que investigadores interesados en identificar genes susceptibles para TOC cooperen, para que las muestras sean de suficiente tamaño, lo cual es necesario para alcanzar un mayor poder estadístico y que sea apropiado para una enfermedad tan compleja como el TOC.

7.- Conclusiones.

- No se encontró asociación genética entre el TOC y el polimorfismo bialélico 5-HTTLPR del gen SLC6A4, utilizando el método de asociación basado en familias.
- Tampoco se observó asociación genética mediante el estudio de casos y controles de la muestra de pacientes TOC con el polimorfismo 5-HTTLPR del gen SLC6A4.
- Las frecuencias de alelos observadas en la muestras son similares a las observadas previamente en población mexicana.

8. - Bibliografía.

Andrews G, Stewart G, Allen R, et al., "The genetics of six neurotic disorders: a twin study", *Journal of Affective Disorders* (1990), 19: 23–29.

Baca-García E. et al., "Association between obsessive–compulsive disorder and a variable number of tandem repeats polymorphism in intron 2 of the serotonin transporter gene", *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* (2007), 31: 416–420.

Báez J., "Hematología Clínica", 6ta edición, editorial Méndez Oteo, México D.F., (1978), pp. 305-306.

Balding D. J., et al., "Handbook of statistical genetics volume 1", 3ra. edición, John Wiley & Sons, Inglaterra, (2007), pp. 1122-1123, 1126, 1146, 1264-1285, 1127-1229.

Barr, L. C., Goodman, W. K., McDougle, C. J., Delgado, P. L., "Tryptophan depletion in patients with obsessive-compulsive disorder who respond to serotonin reuptake inhibitors", *Archives of General Psychiatry* (1994), 51: 309.

Bechtel R., Churchman A., "Handbook of environmental psychology", John Wiley & Sons, Nueva York, E.U.A., (2002), pp. 134-135.

Bellodi L., Sciuto G., Diaferia G., et al., "Psychiatric disorders in the families of patients with obsessive-compulsive disorder", *Psychiatry Research* (1992), 42: 111-120.

Black DW, Noyes R. Jr, Goldstein R. B., Blum N: "A family study of obsessive-compulsive disorder", *Archives of General Psychiatry* (1992), 49: 362-368.

Camarena B. et al., "Association study of the serotonin transporter gene polymorphism in obsessive-compulsive disorder", *International Journal of Neuropsychopharmacology* (2001), 4: 269-272.

Champe P. C., Harvey R. A., "Biochemistry", 3ra. edición, Lippincott-Raven, E.U.A., (2004), pp. 284-286.

Dickel D., "Association Studies of Serotonin System Candidate Genes in Early-onset Obsessive-Compulsive Disorder", *Biological Psychiatry* (2007), 6: 322–329.

DiLalla L. F., "Behavior genetics principles: perspectives in development, personality, and psychopathology", American Psychological Association, Washington D.C., E.U.A., (2004), pp. 3-14, 191-202, 217-222.

Dilip V., et al., "Psychiatry for Neurologists", Humana Press, Nueva Jersey, E.U.A., (2006), pp. 21.

DSM-IV, "Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales", Masson, Barcelona España, (1995), pp. 401, 428-434.

Dykstra L., Grabowski J., et al., "Psychopharmacology: Basic Mechanisms and Applied Interventions", American Psychological Association, Washington, DC, E.U.A., (1992), pp. 50-53.

Firsch A., Michaelovsky F., et al., "Association between Obsessive-Compulsive Disorder and polymorphisms of genes encoding components of the serotonergic and dopaminergic pathways", *European Neuropsychopharmacology* (2000), 10: 205-209.

Ganong, W. F., "Fisiología Médica", 19ª edición., Manual Moderno, México, (2004), pp. 103-114, 289-290.

Greenstein B., "Color atlas of neuroscience: neuroanatomy and neurophysiology", Thieme, Nueva York, E.U.A., (2000), pp. 116-117.

Gross M., "Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells", *European Journal of Biochemistry* (1973), 36: 32-38.

Hanna G.L., Veenstra-VanderWeele J., Cox N.J., et al., "Genome-wide linkage analysis of families with obsessive-compulsive disorder ascertained through pediatric probandos", *American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics* (2002), 114: 541–552.

Heils A. et al., "Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression", *Journal of Neurochemistry* (1996), 66: 2621-2624.

Hu X. Z., Lipsky R. H., Zhu G., et al., "Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder", *American Journal of Human Genetics* (2006), 78: 815–826.

ICD-10, "Clasificación Internacional de Enfermedades", decima edición, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, (2007), pp. 144-146.

Kaplan L., "Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation", 4ta edición, Mosby, E.U.A., (2003), pp. 654, 793.

Karayorgou M., Sobin C., Blundell M. L., et al., "Family-based association studies support a sexually dimorphic effect of COMT and MAO-A on genetic susceptibility to obsessive-compulsive disorder", *Biological Psychiatry* (1999), 45: 1178–1189.

Kendler S. K., et al., "Psychiatric Genetics Review of Psychiatry Series Vol. 24", American Psychiatric Publishing Inc. (2005), pp. 2-14.

Kim S. J., et al., "OCD, factor analyzed symptom dimensions and serotonin transporter polymorphism", *Neuropsychobiology* (2005), 52: 176-182.

Kim S. J., et al., "The genetic studies of OCD and it's future direction", *Yonsei Medical Journal* (2006), 47: 443-454.

Latchman D.S., "Eukaryotic Transcription Factors", 4ta edición, Academic Press, E.U.A., (2004), pp. 12-19, 140.

Lahiri D., Nurnberger J., "A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies", *Nucleic Acids Research* (1991), 19: 5444.

Lehninger A., Nelson D., "Principles of Biochemistry", 4ta. edición, W. H. Freeman & Co., E.U.A., (2004), pp. 660, 859, 860.

Lenane M.C., Swedo S.E., Leonard H., Pauls D.L., et al., "Psychiatric disorders in first degree relatives of children and adolescents with obsessive compulsive disorder", *Journal of American Academic Child and Adolescent Psychiatry* (1990), 29: 407-412.

Leonard H.L., Lenane C., Swedo S.E., Rettew D.C., et al., "Tics and Tourette's disorder: a 2-to 7-year follow-up of 54 obsessive-compulsive children", *American Journal of Psychiatry* (1992), 149: 1244-1251.

Lewis A., "Problems of obsessional illness", *Proceedings of the Royal Society of Medicine* (1935), 29: 325-336.

Lin P.Y., "Meta-analysis of the association of serotonin transporter gene polymorphism with obsessive-compulsive disorder", *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* (2007), 3: 683-689.

Lodish H., Berk A., et al., "Molecular Cell Biology", 5th edición, W H Freeman & Co., E.U.A., (2000), pp. glosario.

Lopez J. J., et al., "Psychiatry as a Neuroscience", John Wiley & Sons, Londres, Inglaterra, (2002), pp. 1-6.

Maj M., Sartorius N., Okasha A., Zohar J., "Obsessive-Compulsive Disorder volume 4", 2da edición, John Wiley & Sons Ltd, Inglaterra, (2002), pp- 1-91, 203-249.

Mössner R., Walitza S., Geller F., et al., "Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder", *The International Journal of Neuropsychopharmacology* (2006), 9: 437-442.

Mycek M., et al., "Pharmacology" 2da edición, Lippincott-Raven, EUA, (2000), pp. 119-125, 241-243.

Nakamura M., Ueno S., Sano A., Tanabe H., "The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants", *Molecular Psychiatry* (2000), 5:32–38.

Nestadt, G., et al., "A Family Study of Obsessive-compulsive Disorder", *Archive Genetic Psychiatry* (2000), 57: 358-363.

Nicolini H., Hanna G. L., Baxter L., et al., "Segregation analysis of obsessive compulsive disorders: preliminary results", *Ursus Medicus Journal* (1991), 1: 25–28.

Nicolini H., "Repitiendo una y otra vez: La enfermedad obsesivo compulsiva", Carracci, México D.F., (2002), pp. 9-11.

O'Connell J., "Methods in Molecular Biology: RT-PCR Protocols", Humana Press, Nueva Jersey (2002), pp. 3, 84-91.

Ozaki N., Goldman D., Kaye W., Plotnikov K., Greenberg B., Rudnick G., et al., "A missense mutation in the serotonin transporter is associated with a complex neuropsychiatric phenotype" *Molecular Psychiatry* (2003), 8:933–936.

Paquette L., "Fundamentos de Química Heterocíclica" 4ta. Edición, Limusa, México, (2004), pp. 157-183, 363-366.

Pauls D. L. et al., "A family study of obsessive-compulsive disorder", *American Journal of Psychiatry* (1995), 152: 76-84.

Pauls D. L., "The genetics of obsessive compulsive disorder: a review of the evidence", *American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)* (2008), 148C: 133–139.

Pérez M., et al., "Differentiation of obsessive-compulsive personality and non-disordered individuals by variation in the promoter region of the serotonin transporter gene", *Anxiety Disorders* (2006), 20: 794–806.

Praschak-Rieder N., et al., "Novel 5-HTTLPR Allele Associates with Higher Serotonin Transporter Binding in Putamen: A [11C] DASB Positron Emission Tomography Study" *Biological Psychiatry* (2007), 62: 327-331.

Primrose S., Old R., "Principles of gene manipulation" 6ta. edición, Blackwell Science, E.U.A., (2001), capítulo 2 y 3, pp. 8-42.

Riddle M.A., Scahill L., King R., et al., "Obsessive compulsive disorder in children and adolescents: phenomenology and family history", *Journal of American Academic Child and Adolescent Psychiatry* (1990), 29: 766-772.

Rinzler C., "Nutrition for dummies", 4^{ta} edición, John Wiley & Sons, E.U.A., (2006), pp. 310-314.

Roth B., "The serotonin receptors: from molecular pharmacology to human therapeutics", Humana Press, Nueva Jersey, E.U.A., (2006), pp. 1-39, 537-540.

Russell P., "iGenetics, A molecular approach", 2da. Edición, Pearson Education Inc., San Francisco, E.U.A., (2006), glosario, pp. 657-670.

Saiz P. et al., "Association study between obsessive–compulsive disorder and serotonergic candidate genes", *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* (2008), 32: 765–770.

Sambrook J., Maniatis T., "Molecular Cloning A laboratory manual", 2^{da}. edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A., (2000), pp. 1-1448.

Shugart Y. Y., Samuels J., Willour V. L., et al., "Genomewide linkage scan for obsessive-compulsive disorder: evidence for susceptibility loci on chromosomes 3q, 7p, 1q, 15q, and 6q", *Molecular Psychiatry* (2006), 11: 763–770.

Sidransky, H., "Tryptophan: biochemical and health implications", CRC Press, E.U.A., (2002), pp. 23, 170, 190.

Smeraldi E., Serretti A., "Serotonin transporter gene-linked polymorphic region: possible pharmacogenetic implications of rare variants", *Psychiatric Genetics* (2006), 16: 153–158.

Smoller J. W., Rosen B., et. al., "Psychiatric genetics: applications in clinical practice", 1ra edición, American Psychiatric Publishing Inc., E.U.A., (2008), pp. 1-25, 77-84.

Tamarin R., "Principles of Genetics", 7ta. edición, Mc-Graw Hill, E.U.A., (2001), pp. 248-263.

Walitza S., Wewetzer C., Gerlach M., et al., "Transmission disequilibrium studies in children and adolescents with obsessive-compulsive disorders pertaining to polymorphisms of genes of the serotonergic pathway.", *Journal of Neural Transmission* (2004), 111(7): 817-25.

Watson J., "Recombinant DNA", 2^{da} edición, Scientific American books, Nueva York, E.U.A., (1998), pp. 79-95.

Willour V. L., Shugart Y., Samuels J., et al., "Replication study supports evidence for linkage to 9p24 in obsessive-compulsive disorder", *American Journal of Human Genetics* (2004), 75: 508–513.

Yurkanis P., "Organic Chemistry", 4^{ta} edición, Prentice Hall, Nueva Jersey, E.U.A., (2003), pp. 458, 884.

Zhang H., Leckman J. F., Pauls D. L., et al., "Genomewide scan of hoarding in sib pairs in which both sibs have Gilles de la Tourette syndrome", *American Journal of Human Genetics* (2002), 70: 896–904.

8.1.- Páginas Web consultadas.

<http://biosun1.harvard.edu/~fbat/fbat.htm>

<http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0106.asp>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=2130993>

http://www.cancer.gov/Templates/db_alpha.aspx?CdrID=348989

<http://www.bio.davidson.edu/courses/GENOMICS/2004/Cobain/angergene.html>

9.- Apéndice.

9.1.- Criterios DSM-IV para el diagnóstico del trastorno obsesivo compulsivo.

(DSM-IV, 1995).

Según el DSM-IV, pueden existir compulsiones de tipo cognoscitivo, que serían consideradas obsesiones según la CIE-10. Además, los criterios diagnósticos de la CIE especifican una duración mínima de los síntomas de por lo menos 2 semanas. Se requiere cumplir los puntos A, B, C, D y E.

A. Se cumple para las obsesiones y las compulsiones:

Las obsesiones se definen por (1), (2), (3) y (4):

- (1) Pensamientos, impulsos o imágenes recurrentes y persistentes que se experimentan en algún momento del trastorno como intrusos e inapropiados, y causan ansiedad o malestar significativos.
- (2) Los pensamientos, impulsos o imágenes no se reducen a simples preocupaciones excesivas sobre problemas de la vida real.
- (3) La persona intenta ignorar o suprimir estos pensamientos, impulsos o imágenes, o bien intenta neutralizarlos mediante otros pensamientos o actos.
- (4) La persona reconoce que estos pensamientos, impulsos o imágenes obsesivos son el producto de su mente (y no vienen impuestos como en la inserción del pensamiento).

Las compulsiones se definen por (1) y (2):

- (1) Comportamientos (p. Ej., lavado de manos, puesta en orden de objetos, comprobaciones) o actos mentales (p. Ej., rezar, contar o repetir palabras en silencio) de carácter repetitivo, que el individuo se ve obligado a realizar en respuesta a una obsesión o con arreglo a ciertas reglas que debe seguir estrictamente.
- (2) El objetivo de estos comportamientos u operaciones mentales es la prevención o reducción del malestar o la prevención de algún acontecimiento o situación negativos; sin embargo, estos comportamientos u operaciones mentales o bien no están conectados de forma real con aquello que pretenden neutralizar o prevenir, o bien resultan claramente excesivos.

B. En algún momento del curso del trastorno la persona ha reconocido que estas obsesiones o compulsiones resultan excesivas o irracionales. **Nota:** Este punto no es aplicable en los niños.

C. Las obsesiones o compulsiones provocan un malestar clínico significativo, representan una pérdida de tiempo (suponen más de 1 hora al día) o interfieren marcadamente con la rutina diaria del individuo, sus relaciones laborales (o académicas) y su vida social.

D. Si hay otro trastorno del Eje I, el contenido de las obsesiones o compulsiones no se limita a él (p. ej., preocupaciones por la comida en un trastorno alimentario, arranque de cabellos en la tricotilomanía, inquietud por la propia apariencia en el trastorno dismórfico corporal, preocupación por las drogas en un trastorno por consumo de sustancias, preocupación por estar padeciendo una grave enfermedad en la hipocondría, preocupación por las necesidades o fantasías sexuales en una parafilia o sentimientos repetitivos de culpabilidad en el trastorno depresivo mayor).

E. El trastorno no se debe a los efectos fisiológicos directos de una sustancia (p. ej. drogas, fármacos) o de una enfermedad médica.

Especificar si:

Con poca conciencia de enfermedad: si, durante la mayor parte del tiempo del episodio actual, el individuo no reconoce que las obsesiones o compulsiones son excesivas o irracionales.

Evolución. Las personas que presentan un trastorno obsesivo-compulsivo reconocen en algún momento del curso del trastorno que las obsesiones o las compulsiones son excesivas o irracionales.

Este requisito no se exige en el caso de los niños porque no disponen todavía de la suficiente capacidad cognoscitiva para llegar a conclusiones de este tipo. Sin embargo, incluso en los adultos puede observarse un amplio espectro en el nivel de comprensión relativo a la racionalidad de las obsesiones o compulsiones.

El individuo reconoce la irracionalidad de sus obsesiones o compulsiones cuando puede sentirse dispuesto a resistirlas, e incluso puede llegar a intentarlo. Puede invadirle una

sensación progresiva de ansiedad o tensión que suele aliviarse cediendo a los actos compulsivos. En el curso del trastorno, y después de repetidos fracasos de resistirse, concluye no volver a desear combatirlas nunca más e incorporar estas compulsiones a sus actividades diarias.

9.2.- Soluciones utilizadas en este estudio (**Sambrook et al., 2000**).

Estas soluciones las que en mayoría se utilizan para diversos protocolos en Genética Psiquiátrica.

Nota: Utilizar material volumétrico adecuado (matraces aforados). Todas las soluciones una vez preparadas y ajustadas se filtran al vacío. Algunas inclusive requieren ser esterilizadas.

Se esteriliza el material a 121 °C, 15-20 psi por 20 minutos.

Toda solución o reactivo que estén en frascos opacos, se deben proteger de la luz en el contenedor que se coloquen. Todos las soluciones se aforan con agua desionizada. Por lo general, se filtra con una membrana de 0.45 µm si se va a esterilizar. Si no se esteriliza, se filtra con una membrana 0.20 µm. La membrana con la que se filtre debe ser colocada con pinzas en el sistema Millipore. No usar las manos para colocarla. Estas son las soluciones:

EDTA (pH 8.0, 0.5 M)	Tris HCl pH 7.6 10mM	Fenol
KCl (0.5 M)	MgCl ₂ 10 mM	SDS 10%
Trisma base 1 M (pH 8.0)	KCl 10 mM	Soluciones para realizar la electroforesis.
Trisma base 1 M (pH 7.6)	EDTA 2 mM	TBE 10x (1L)
NaCl 1M	NaCl 0.4 M	TBE 5x (1L)
MgCl ₂ 1M	TE	Tris HCl 1 M pH 8
Etanol 70%	TEN 500 mL	TKM-2
Solución de bromuro de etidio	Tinte de electroforesis	Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
TKM-1	Fenol equilibrado a pH 7.8	Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)

10. Glosario.

Conviene revisar las referencias consultadas para este glosario ya que entran en mayor detalle, la gran mayoría es extracto del libro de Russell Peter. Este glosario está escrito de manera breve y concisa (**Russell, 2006; Watson, 1998; Lodish, 2000; Tamarin, 2001**).

Alelo es una de las dos o más formas alternativas de un solo gene que pueda existir en el mismo locus en el genoma. Todos los alelos de un gene determinan el mismo rasgo hereditario (p. ej. Color de ojos), pero cada uno tiene una secuencia de nucleótidos única, que puede resultar en fenotipos distintos (p. ej. ojos azules).

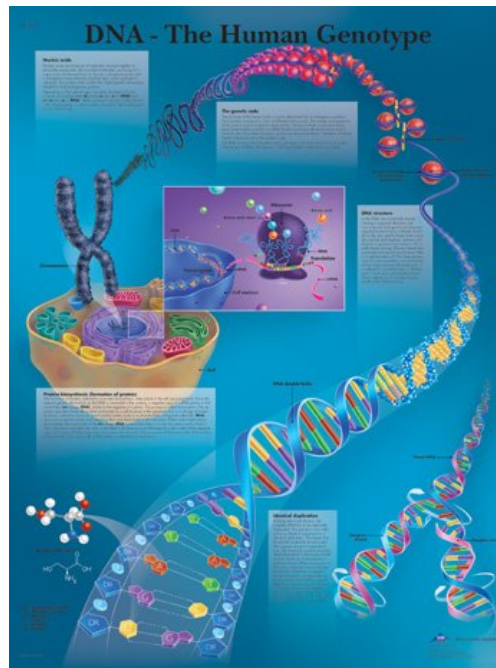
El **ácido desoxirribonucleico**, o **ADN**, es una macromolécula con un nucleótido, y cada nucleótido, a su vez, está formado por un azúcar (la desoxirribosa), una base nitrogenada (que puede ser Adenina, Timina Citosina y Guanina) y un grupo fosfato que forma parte de todas las células. La forma doble helicoidal es la forma en que el material genético se presenta en la mayoría de los organismos.

El **ácido ribonucleico**, o **ARN**, es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos. El ARN celular es lineal y de hebra sencilla, pero en el genoma de algunos virus es de doble hebra.

El ARN es mucho más versátil que el ADN. Los tres mayores ARN presentes son: el ARN ribosomal (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y el ARN mensajero (ARNm), haciendo cada uno su labor esencial para la síntesis de proteína. El ARNm es la secuencia final que codifica la secuencia de aminoácidos para formar la proteína (traducción).

Para poder entender mejor la ubicación del **ADN en la célula**, se anexa la figura 15.

Figura 15: Esquema que muestra los niveles de organización celular hasta llegar al ADN.



Un **autoreceptor** es un receptor que modula mediante control negativo la secreción del transmisor. Por ejemplo: Sistema de retroalimentación autoinhibitorios.

Los **factores de transcripción** son varias proteínas que interactúan con la polimerasa y sirven para que la ARN polimerasa pueda localizar al promotor o para que se pueda adherir establemente al ADN.

Un **cromosoma** en células eucarióticas, es una estructura lineal compuesta de una molécula de ADN acomplexada con proteína (histonas, nucleosomas). Cada especie eucariótica tiene su número característico de cromosomas en el núcleo de las células. La mayoría de las células procarióticas poseen un solo cromosoma circular.

Un **homocigoto** es cuando en un organismo diploide contiene los mismos alelos en uno o varios loci produciendo gametos de genotipo idéntico.

Un **heterocigoto** es cuando en un organismo diploide contiene alelos distintos en uno o varios loci produciendo gametos de genotipo distinto.

Una **enzima de restricción** (o endonucleasa de restricción) es una enzima que reconoce y escinde el ADN en secuencias específicas de dicho ADN (**secuencias de reconocimiento o sitios de restricción**), lo cual genera un fragmento más pequeño.

Un **exón** es un segmento de gen que codifica una proteína y su precursor (el pre-ARNm) especifica una secuencia de aminoácidos y es retenido en el ARNm funcional.

El **fenotipo** son las características observables y tangibles de un organismo que son producidas por un genotipo y su interacción con el medio ambiente.

La **frecuencia alélica** es la proporción de un alelo en particular en un locus de un pool genético. La suma de las frecuencias alélicas de un locus dado es igual a 1.

El **genotipo** es la completa composición alélica genética. El término se usa en referencia a los alelos específicos presentes en sólo uno o en un número de casos limitados del loci genético.

El **genoma** es la cantidad total de material genético en un juego de cromosomas.

El **gene** es la unidad física y funcional que ayuda a determinar los rasgos heredados de los padres a su descendencia (conocido como factor Mendeliano). En términos moleculares, un gene es una secuencia de nucleótidos del ADN que especifica un polipéptido o ARN. Alteraciones en la secuencia del gene produce la aparición de especies, y variaciones individuales.

El **haplotipo** se define como todo el inventario de alelos en el humano.

El **intrón** es un segmento de gene que codifica para una proteína y es el precursor del ARNm (pre-ARNm) que no especifica una secuencia de aminoácido. Los intrones en pre-ARNm son removidos por splicing de ARNm.

El **locus** (plural, loci) es la posición de el gene en el mapa genético; el lugar específico en el cromosoma donde se localiza el gene.

Un **gene marcador** son alelos que producen diferencias fenotípicas detectables útiles en el análisis genético.

Un **marcador de ADN** son variaciones entre individuos en la secuencia en una región específica del ADN que son detectadas por análisis molecular del ADN y se utiliza en el análisis genético.

Un **polimorfismo del ADN** es una variación en la secuencia de nucleótidos o en el número de unidades repetidas en tándem en un locus particular en el genoma. Comúnmente, este término se usa para marcadores de ADN, variaciones que se localizan fuera de los genes y que se detectan con análisis molecular. Los marcadores genéticos es una región de ADN cuya secuencia varía entre individuos y es útil en el análisis genético.

Cuando se dice que un **polimorfismo sea funcional** se hace referencia a la genómica funcional, que es el análisis comprensivo de las funciones de los genes y de las secuencias no génicas incluyendo patrones de expresión de genes y su control. Un polimorfismo no funcional en genética psiquiátrica se refiere a que no afecta en la transcripción a mRNA

El **promotor** es una región en el ADN que identifica la ARN polimerasa y se asocia a él inmediatamente antes de iniciar la transcripción. Contiene la información para permitir la transcripción del ARNm y es el sitio mayor donde se controla la expresión de los genes.

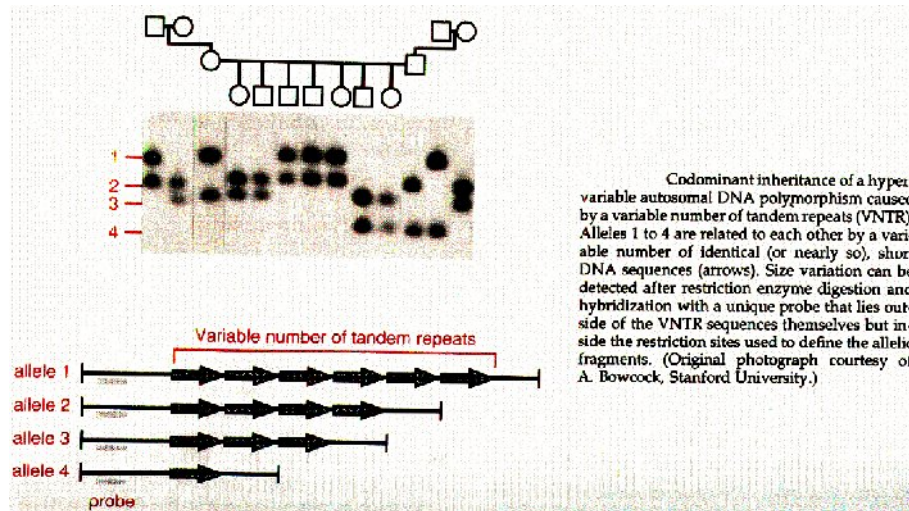
El **splicing de ARNm** es un proceso mediante el cual el intrón entre dos exones (secuencia codificante) en un precursor de ARNm, es cortado y los exones son ligados.

El **número variable de repeticiones en tándem (VNTR's)**, también llamado minisatélites, son repeticiones de pares de bases (pb) partiendo de 7 a varias decenas de pares de bases de longitud. Un individuo puede ser homocigoto o heterocigoto para alelos en un locus.

Hay dos tipos de **loci de VNTR**: loci único y loci multicopia. Esto es, puede haber una sola copia de un locus de VNTR en el genoma de un organismo, o puede haber un número de copias esparcidas alrededor del genoma.

Si una sonda detecta solo un locus de VNTR, se le llama sonda monolocus ó sonda de un solo locus. Sondas que detectan loci de VNTR en un número de sitios en el genoma se les conoce como sondas multilocus. Un ejemplo de un VNTR de presenta en la figura 16.

Figura 16: Ejemplo ilustrativo de un VNTR.



En este esquema se ejemplifica la presencia y la heredabilidad de las VNTR's en un árbol genealógico familiar. En este caso, se usa al VNTR como un marcador genético.

En el caso de los **STR (o SNP)**, son secuencias ADN de 2-6 pb repetidas en tándem unas cuantas veces o hasta 100 veces. Se pueden repetir dinucleótidos o trinucleótidos. Hay mucha menor cantidad de loci de VNTR que de loci de STR en el genoma humano.

Los **loci de VNTR** también muestran polimorfismos y dado que los VNTR son largos y para amplificarse se complica analizarlo por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por lo mismo los VNTRs se estudian por medio del Southern Blot.

Amplicón es la secuencia de ADN la cual se amplificará mediante la técnica de PCR.

Sitio de restricción es una secuencia de nucleótidos de ADN que son reconocidos por una enzima.

Las **enzimas de restricción o endonucleasas** son proteínas que cortan al ADN no modificado en unos fragmentos largos y discretos. Dichas enzimas tienen una gran especificidad al

reconocer secuencias en la doble hélice del ADN y corta la cadena polinucleótida dentro de dicha secuencia para dar paso a fragmentos discretos con secuencia y longitud definida.

La **electroforesis** es una técnica de biología molecular para separar moléculas (en este caso ADN) en una mezcla bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado a dicha mezcla. Las moléculas disueltas se mueven en el campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación: carga/masa.

La **técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** es una técnica de biología molecular, fue descubierta por Kary Mullis a mediados de los 80`s, haciendo una aproximación en el estudio y en el análisis de genes. La PCR permite, al ser una técnica muy selectiva, producir una enorme cantidad de secuencias (amplificación) de ADN (ácido desoxirribonucleico) específicas sin recurrir a la clonación, estas son sus ventajas, el ser sensible y rápido.

La desventaja de la PCR es que si se comete un error en el primer ciclo de la PCR, todas sus derivadas tendrán ese mismo error. Existen enzimas disponibles para PCR que tienen la actividad de probar la hebra y reduce significativamente la frecuencia del error.

La PCR explota ciertas características inherentes de la replicación del ADN. La ADN polimerasa utiliza ADN de una sola hebra (ADNss) como su molde (molde) para la síntesis de una nueva hebra complementaria. La PCR se realiza con un aparato especial diseñado especialmente para PCR llamado termociclador. Este aparato varía la temperatura para realizar la PCR.

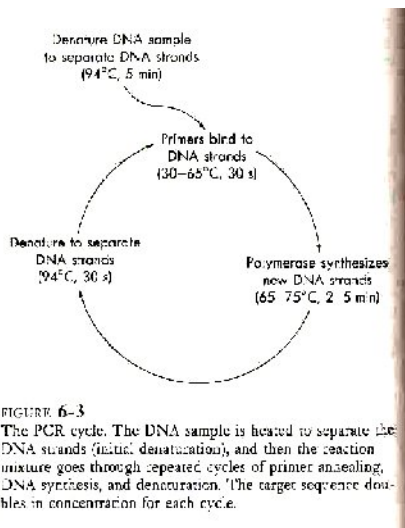
El protocolo para realizar la PCR difiere, pero de manera generalizada se realiza de esta forma (considérese que se hace en un termociclador). La PCR no amplifica de manera eficiente fragmentos de 3 kb en adelante. Para ello se recurre a la Long Accurate PCR (LA-PCR) que se le adiciona una segunda polimerasa termoestable con la capacidad de leer errores en la replicación. Se usa específicamente con fragmentos superiores a los 5 kb.

Hay factores importantes que alteran el desarrollo de la PCR, dado que la especificidad depende de manera crucial en los oligonucleótidos. Este es un listado de factores importantes para elegir a los oligonucleótidos:

- El oligonucleótido debe ser entre 17-30 pb de longitud preferentemente.
- El contenido ideal de enlaces GC en la muestra debe ser alrededor del 50%. Para oligonucleótidos con contenido bajo de GC, es conveniente escoger a un largo oligonucleótido para evitar una baja temperatura de fusión.
- Corridas de muchos ciclos deben evitarse porque la reacción se satura, lo cual genera productos inespecíficos.
- Deben ser evitados los oligonucleótidos con estructura secundaria significativa.
- No debe existir complementariedad entre los dos oligonucleótido.

La gran mayoría de los oligonucleótidos que cumplen dicho listado son capaces de funcionar adecuadamente, aunque no todos los juegos de oligonucleótidos son comparados son igual de efectivos aunque se hagan en condiciones óptimas. En la figura 17 se muestra el proceso que se realiza en cada ciclo de una PCR.

Figura 17: Esquema que muestra el proceso de cada ciclo realizado en el termociclador al realizar una PCR.



Cada ciclo de PCR que se corra duplica la cantidad de la siguiente forma (Nótese en la figura 18 que hasta el tercer ciclo se amplifica el ADN deseado).

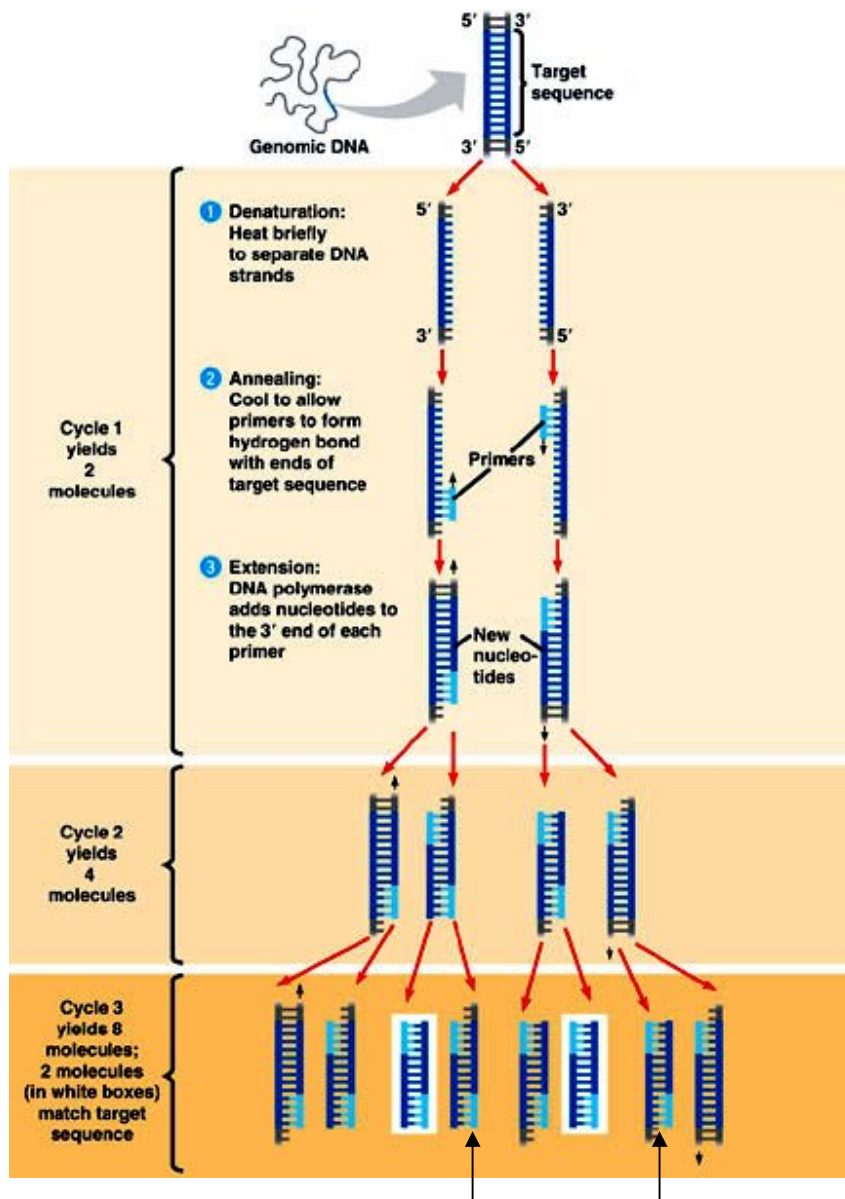
Figura 18: El algoritmo numérico del producto de interés obtenido durante cada ciclo de PCR que se realice.

TABLE 6-1 PCR Amplification of DNA Fragment	
CYCLE NUMBER	NUMBER OF DOUBLE-STRANDED TARGET MOLECULES
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1024
13	2048
14	4096
15	8192
16	16,384
17	32,768
18	65,536
19	131,072
20	262,144
21	524,288
22	1,048,576
23	2,097,152
24	4,194,304
25	8,388,608
26	16,777,216
27	33,554,432
28	67,108,864
29	134,217,728
30	268,435,456
31	536,870,912
32	1,073,741,824

En la siguiente gráfica se puede observar de manera numérica como ocurre que las hebras de interés se dupliquen a partir del tercer ciclo al realizar la PCR.

En la siguiente figura 19 se ejemplifica como funciona la técnica del PCR a grosso modo.

Figura 19: Esquema que muestra el como se desnaturaliza el ADN, alinean los oligonucleótidos y se crean los templados de la secuencia deseada. Nótese que las 2 flechas muestran que a partir del tercer ciclo se obtiene el producto de interés.



Las dos moléculas con flecha son la secuencia de interés aislada en su totalidad. Se puede observar gráficamente como hasta el tercer ciclo se comienza a tener la secuencia deseada.

Hay otras dos variantes que son similares a la PCR que son la PCR en tiempo real y la PCR de transcripción reversa.

La **PCR en tiempo real (RT-PCR)** es una modificación a la PCR que hasta puede cuantificar la cantidad amplificada, la cual sirve para conocer la cantidad inicial de ADN presente. Tiene la

ventaja que es más rápida que la PCR original y que no requiere electroforesis ni tinción para revelar el resultado.

La **PCR de transcripción reversa** es un protocolo que sirve como una técnica más sensible para detectar y amplificar al ARN mensajero (ARNm) de la muestra, inclusive, tiene la virtud de poder cuantificar la cantidad total amplificada de ADN (*O'Connell, 2002*).

Las **electroforesis de geles por agarosa** son convenientes para fragmentos de ADN de un rango de unos cuantos cientos de pares de bases hasta 20 kb, mientras que los geles de poliacrilamida se prefieren para fragmentos de ADN más pequeños.

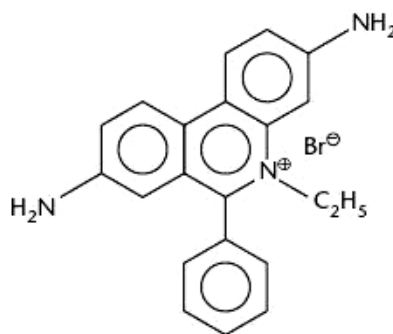
El mecanismo responsable para la separación de las moléculas de ADN por su peso molecular durante la electroforesis del gel no está del todo comprendido, se sabe que el ADN contiene una carga negativa la cual viajará al cátodo del circuito. La migración de las moléculas de ADN por los poros de la matriz del gel juega un rol importante en la separación del peso molecular (en este caso, pares de bases) dado que la movilidad electroforética del ADN en soluciones libres es independiente al peso molecular. Un gel de agarosa es una compleja red de moléculas poliméricas que su tamaño de poro promedio depende de la composición del buffer y del tipo y concentración de agarosa utilizada. La fluorescencia microscópica en tiempo real ha revelado que el movimiento del ADN presenta un comportamiento elástico al estirarse en la dirección del campo eléctrico y luego contrayéndose en pelotas densas. Mientras sea más grande el tamaño del poro del gel, más grande es la pelota de ADN que puede atravesar y, por lo tanto, son más largas las moléculas que se pueden separar. Una vez que el volumen globular de la molécula de ADN excede el tamaño del poro, la molécula de ADN solo puede pasar por reptación. Esto solo ocurre con moléculas de alrededor de 20 kb de tamaño y es difícil separar moléculas más grandes que éstas, por lo que se recurre a campos eléctricos en pulsos. Por ello, se usan gel de agarosa en electroforesis en campos magnéticos en pulsos (sirve para genomas de 200-300 kb hasta 10 Mb).

Conforme avance la muestra de ADN a través del gel, el campo eléctrico va a generar calor por el efecto Joule, por lo que es recomendable ponerle a la cámara de electroforesis un ventilador mientras corre la muestra, ya que se calentará el gel y dañará su porosidad.

Está demostrado que la tasa de migración de las moléculas de ADN es inversamente proporcional a los logaritmos del peso molecular. La electroforesis en gel generalmente se desarrolla con un marcador de fragmentos de ADN que tienen un tamaño conocido de pb (escalera de ADN), el cual permite determinar acertadamente el tamaño de la molécula de

ADN mediante la interpolación. Una ventaja particular de la electroforesis de gel es que las bandas de ADN pueden ser detectadas con una alta sensibilidad. Las bandas de ADN contenidas en el gel se tiñen con el pigmento intercalante bromuro de etidio (figura 20), el cual puede detectar concentraciones de ADN hasta de 0.05 μg en la fluorescencia visible cuando al gel se le ilumina con rayos U.V. Falta mencionar que cuando la muestra se le expone demasiado tiempo a la luz U.V., la banda comienza a degradarse y deja de visualizarse (*Primrose, 2001*).

Figura 20: Esquema del bromuro de etidio, que revela al UV al ADN al ser un intercalador de bases.

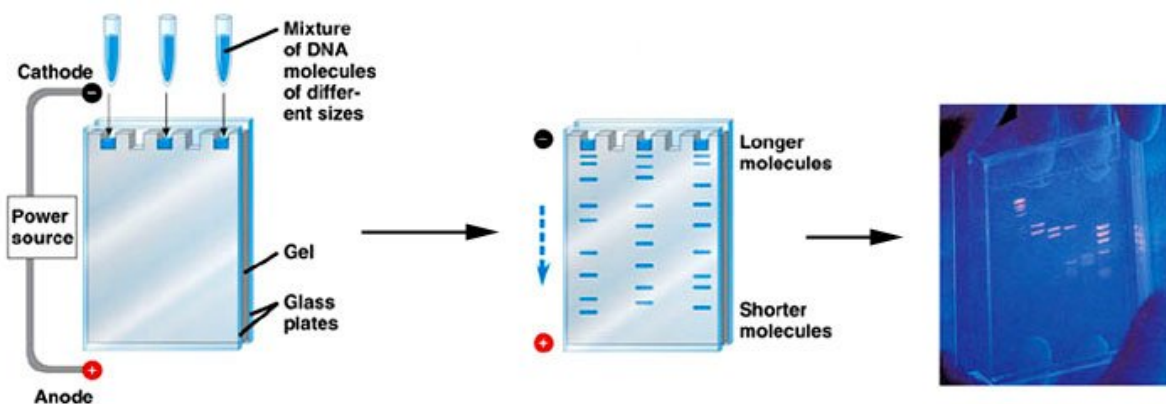


Ethidium bromide.

(*Primrose, 2001*)

En una electroforesis se realiza el siguiente procedimiento (figura 21) para que se visualicen las bandas de ADN. La electroforesis es de utilidad para evaluar la calidad del ADN extraída por el método de Lahiri (o extraídas mediante kits de extracción de ADN) o para la genotipificación.

Figura 21: Esquema del proceso global del como se realiza la electroforesis.



(*Primrose, 2001*)