Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

"Análisis molecular del gen *SLC6A4* en pacientes mexicanos con trastornos de la conducta alimentaria: identificación de variantes raras y comunes"

TESIS

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

PRESENTA

Biol. Sandra Hernández Muñoz

COMITÉ TUTORAL

Dra. Beatriz Camarena Medellín (Codirectora)

Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa (Codirector)

Dra. Mónica Flores Ramos (Asesora)

Ciudad de México, 08 2021

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de “Farmacogenética”, de la Subdirección de Investigaciones Clínicas del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, bajo la dirección de la Dra. Beatriz Elena Camarena Medellín y del Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo de la Dra. Mónica Flores Ramos.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 391032, que comprendió del periodo de 01 de septiembre de 2016 al 31 de agosto de 2020. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

COMITÉ TUTORAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

"Análisis molecular del gen *SLC6A4* en pacientes mexicanos con trastornos de la conducta alimentaria: identificación de variantes raras y comunes"

Sandra Hernández Muñoz

Agosto 2021

Dra. Beatriz Elena Camarena Medellín
Depto. Farmacogenética
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz
camare@imp.edu.mx

Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa
Lab. Biotecnología, Planta Piloto
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
azaola@correo.xoc.uam.mx

Dra. Mónica Flores Ramos
Directora de Enseñanza
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz
monica.flores@imp.edu.mx

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00118
Matrícula: 2163805474

Análisis molecular del gen SLC6A4 en pacientes mexicanos con trastornos de la conducta alimentaria: identificación de variantes raras y comunes.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 27 del mes de agosto del año 2021 en la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA ESPINOSA
DRA. MONICA FLORES RAMOS
DRA. ALMA DELIA GENIS MENDOZA
DR. RAUL IVAN ESCAMILLA OROZCO
DRA. BEATRIZ ELENA CAMARENA MEDELLIN

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

DE: SANDRA HERNANDEZ MUÑOZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
Casa abierta al tiempo
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

Sandra Hernández M

SANDRA HERNANDEZ MUÑOZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

MTRA. MARIA ELENA CONTRERAS GARFIAS

PRESIDENTE

DR. ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA ESPINOSA

VOCAL

DRA. MONICA FLORES RAMOS

VOCAL

DRA. ALMA DELIA GENIS MENDOZA

VOCAL

DR. RAUL IVAN ESCAMILLA OROZCO

SECRETARIA

DRA. BEATRIZ ELENA CAMARENA MEDELLIN

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

“Es preciso entender la tesis como una ocasión única para hacer algunos ejercicios que nos servirán mientras vivamos”.

Umberto Eco

Dedico esta tesis a José, José Felipe y Ximena por compartir conmigo esta gran aventura.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres quienes me dieron las herramientas necesarias para emprender sueños y realizarlos.

Al Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Xochimilco, que me brindó la oportunidad de recibir una educación excepcional.

Al Departamento de Farmacogenética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, por permitirme realizar un sueño tan anhelado.

A la Dra. Beatriz Camarena Medellín por darme su apoyo académico y moral. Compartió su talento y dedicación para que este trabajo se lograra. Además, me enseño que nunca hay que darse por vencido.

Al Dr. Alejandro Azaola Espinosa por brindarme sus conocimientos y darme su apoyo moral.

A la Dra. Mónica Flores Ramos por enseñarme la relevancia clínica en los trastornos alimentarios.

Al M.I.B.B Alejandro Aguilar por enseñarme las técnicas de laboratorio y tenerme paciencia, además, agradezco su amistad.

A mis compañeros de trabajo del Dpto. de Farmacogenética Alejandro, Carlo, Marco, Male, Andrés, Lidia, por compartir seminarios y excelentes charlas en la comida.

A la clínica de trastornos de la conducta alimentaria por aportar la información clínica y muestras de los pacientes.

Finalmente, a los pacientes, sin quienes este trabajo no solo no sería posible, sino que carecería de sentido.

ABREVIATURAS

TCA	Trastornos de la conducta alimentaria
ANR	Anorexia nervosa restrictiva
BNP	Bulimia nervosa purgativa
TANE´s	Trastornos de la conducta alimentaria no específicos
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
CCK	Colecistoquinina
CART	Transcriptor relacionado con cocaína y anfetamina
5-HT	Serotonina
NPY	neuropéptido Y
ArRP	Proteína relacionada con Agouti
Orex	Orexina
MSH	Hormona melanocortina
ARC	Núcleo arqueado
PVN	Núcleo paraventricular
LHC	Núcleo lateral
MCH	Hormona concentradora de melanina
POMC	Proteína propiomelanocortina
5-HT1B	Receptor de 5-Hidroxitriptamina 1B
5-HT2C	Receptor de 5-hidroxitriptamina 2C
M-cpp	Cloferilpirerazina
5-HIAA	Ácido 5-hidroxindolacético
LCR	Líquido cefalorraquídeo
SERT, 5-HTT	Proteína transportadora a serotonina
SLC6	Familia de transportadores de soluto
SNC	Sistema nervioso central
MAO	Monoamina oxidasa
PKC	Proteína kinasa C
PKG	Proteína kinasa K
P33 MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno

Syn1A	Sintantina 1A
SLC6A4	Gen del transportador a serotonina/ portador de solutos familia 6 miembro 4 en humanos
CNV	Variantes estructurales de número variable
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
ExAC	Consorcio de agregación del exoma
gnomAD	Base de datos de agregación del genoma
GWAS	Estudio de asociación del genoma amplio
WES	Estudio de secuenciación del exoma
CD/CV	Hipótesis de estudios de enfermedades comunes y variantes comunes
CD/RV	Hipótesis de estudios de enfermedades comunes y variantes raras
MAF	Frecuencia del alelo menor
PGC-ED	Consorcio de genómica psiquiátrica en los TCA
ESSRA	Gen del receptor alfa relacionado con estrógeno
HDACA	Gen de la histona deacetilasa
EDI	Inventario de trastornos alimentarios de la conducta alimentaria
Tm	Temperatura de alineamiento
SLC18A2	Gen del transportador de soluto familia 18 miembros A2. Transportador de monoaminas en las vesículas sinápticas
HTR1D	Gen del receptor 5-hidroxitriptamina 1D
5-HTTLPR	Región promotora del gen transportador a serotonina

INDICE GENERAL

1. NTRODUCCIÓN 01
2.ANTECEDENTES 02
2.1Definición de TCA Definición 02
2.2 Fenotipos clínicos asociados a AN y BN 04
2.3 Epidemiología en AN y BN 07
2.4 Etiología 08

3. Conducta alimentaria 10
3.1 Función del hipotálamo en el control de la ingesta de alimentos 11
3.2 Neurobiología de la AN y BN 13
3.3 Hipótesis serotoninérgica en AN y BN 15

4. Transportador a serotonina (SERT, 5-HTT) 18
4.1 Estructura de SERT 20
4.2 Regulación fisiológica del transportador a serotonina 21
4.3 Gen del transportador a serotonina *SLC6A4* 22
4.4 Variantes genéticas del *SLC6A4* 23
4.5 Variabilidad genética en la población mexicana 25

5. Estudios de epidemiología genética 27
5.1 Estudios en familias 27
5.2 Estudios en gemelos 28
5.3 Estudios de ligamiento genético 29
5.4 Estudios de asociación genética 29
5.5 Estudios de asociación del genoma completo (GWAS) 31
5.6 Estudios de secuenciación del exoma (WES) 32

6. Asociación sintética 34
6.1 Selección de fenotipos en los trastornos alimentarios 35

7.1 JUSTIFICACIÓN 38
7.2 HIPÓTESIS 40
7.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 40
7.4 OBJETIVO GENERAL 40
7.4.1OBJETIVOS PARTICULARES 40

8. MATERIAL Y METODOS 41
8.1 Muestra de estudio 41
8.2 Secuenciación de los exones 1, 2, 3, 8 y 9 del *SLC6A4* 44
8.3 Análisis de datos de la secuenciación 46
8.4 Espectro de variantes genéticas en el *SLC6A4* 46
*8.*5 Análisis *in silico* de la predicción de la proteína 47
8.6 Análisis estadístico 48

9. RESULTADOS 49
9.1 Identificación de los fenotipos extremos en los pacientes con TCA 49
9.1.2 Análisis discriminante entre los grupos de ANCP, BNP y BNNP 51
9.1.3 Análisis de clúster de k-medias en mujeres con BNP 53
9.1.4 Descripción de los fenotipos extremos identificados 54
9.2 Análisis genético 55
9.2.1 Identificación de variantes genéticas en el fenotipo restrictivo 56
9.2.2 Variantes raras y comunes en el fenotipo restrictivo 61
9.3 Identificación de variantes genéticas en el fenotipo purgativo 62
9.3.1 Variantes raras y comunes en el fenotipo purgativo 66

10 DISCUSIÓN 68
11 CONCLUSIONES 76
12. LIMITACIONES DEL ESTUDIO 77
12 PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO 78
13 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 79
14 ANEXO 110

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Lista de tablas

Tabla 1. Descripción de los tipos de TANE´s de acuerdo al DSM-IV-TR (página 03).
Tabla 2. Complicaciones clínicas en los TCA (página 04).
Tabla 3. Sustancias que se encuentran regulando la conducta alimentaria (página 12).
Tabla 4. Estudios de imagen cerebral realizados en pacientes con AN y BN (página 15).
Tabla 5. Hipótesis serotoninérgica en AN y BN (página 18)
Tabla 6. Estudios de asociación basada en familias entre el 5-HTTLPR y TCA (página 30).
Tabla 7. Estudios de asociación de casos y controles del 5-HTTLPR y TCA (página 31).
Tabla 8. Estudios de GWAS realizados en AN (página 32).
Tabla 9. Estudios de WES realizados en los trastornos alimentarios (página 34).
Tabla 10. *Primers* que se usaron para la amplificación de los exones del *SLC6A4* (página 44).
Tabla 11. Análisis por ANOVA de las características clínicas de 428 pacientes con TCA (página 50).
Tabla 12. Análisis por ANOVA de las características clínicas de mujeres con AN y BN (página 51).
Tabla 13. Prueba de inclusión de pasos y correlación canónica (página 52).
Tabla 14. Prueba de igualdad de medias de lambda de Wilkins entre ANCP, BNP y BNNP (página 53).
Tabla 15. Matriz de reclasificación de los diagnósticos clínicos (página 53).
Tabla 16. Características clínicas de las clases en 171 mujeres con BNP (página 54).
Tabla 17. Análisis estadístico de la interacción en mujeres con BNP (página 54).
Tabla 18. Prueba de t-Students de las características clínicas del fenotipo restrictivo y purgativo (página 55).
Tabla 19. Número de variantes identificadas en los cinco exones del gen *SLC6A4* en el fenotipo restrictivo y el grupo control (página 56).
Tabla 20. Frecuencia del alelo menor en el fenotipo restrictivo (página 62).
Tabla 21. Número de variantes genéticas identificadas en los cinco exones del *SLC6A*4 en el fenotipo purgativo (página 63).
Tabla 22. Frecuencia del alelo menor en el fenotipo purgativo (página 67).

Lista de figuras

Figura 1. Distribución de los diagnósticos clínicos en los trastornos alimentarios (página 02).
Figura 2. Modelo etiológico del tipo biopsicosocial en TCA (página 10).
Figura 3. Vías neurobiológicas relacionadas con la conducta alimentaria (página 13).
Figura 4. Árbol filogenético de los miembros de la familia SLC6 (página 19).
Figura 5. Distribución de la familia de transportadores SLC6 en humanos (página 20).
Figura 6. Localización del gen *SLC6A4* en humanos (página 22).
Figura 7. Presentación de la región del promotor del 5-HTTLPR del gen *SLC6A4* (página 23).
Figura 8. Distribución de diagnósticos clínicos en 428 pacientes con TCA (página 49).
Figura 9. Amplificación de los productos de PCR (página 56).
Figura 10. Tipos de variantes genéticas en el fenotipo restrictivo (página 57).
Figura 11. Variantes sinónimas, no sinónimas y nuevas en el fenotipo restrictivo (página 57).
Figura 12. Electroferogramas en el fenotipo restrictivo y el grupo control (página 58).
Figura 13. Electroferogramas en el fenotipo restrictivo y el grupo control (página 59).
Figura 14. Electroferograma en el fenotipo restrictivo y grupo control (página 60).
Figura 15. Electroferogramas de los SNPs identificados en el fenotipo restrictivo y el grupo control (página 61).
Figura 16. Localización de las variantes genéticas en los cinco exones del gen *SLC6A4* en el fenotipo restrictivo (página 62).
Figura 17. Tipo de variantes genéticas en el fenotipo purgativo (página 63).
Figura 18. Variantes sinónimas, no sinónimas y nuevas en el fenotipo purgativo (página 64).
Figura 19. Electroferogramas del fenotipo purgativo y el grupo control (página 64).
Figura 20. Electroferograma del fenotipo purgativo y el grupo control (página 65).
Figura 21. Electroferograma de los SNPs identificados en el fenotipo purgativo y el grupo control (página 66).
Figura 22. Localización de las variantes genéticas en los cinco exones del gen *SLC6A4* en el fenotipo purgativo (página 67).

RESUMEN

Antecedentes: la evidencia acumulada indica que las alteraciones en el sistema de la serotonina (5-HT) están relacionadas con cambios en el comportamiento alimentario. El transportador de serotonina está codificado por el gen *SLC6A4* y ha sido un candidato interesante para el tipo restrictivo de anorexia nerviosa (AN-R) y la bulimia nerviosa purgativa (BNP). Se han identificado variantes funcionales en la región codificante que podrían contribuir a comprender el papel de este gen en los trastornos alimentarios. El objetivo fue identificar variantes genéticas en cinco exones del gen *SLC6A4* mediante la secuenciación por el método de Sanger en pacientes con anorexia nerviosa restrictiva, bulimia nerviosa purgativa y un grupo de controles sanos.

Método: La muestra consistió en 86 pacientes y 50 sujetos sanos. Obtuvimos muestras de ADN de todos los sujetos y realizamos análisis de secuencia por Sanger de los exones 1, 2, 3, 8 y 9. Las secuencias de todas las muestras se compararon con la secuencia de referencia del gen *SLC6A4*.

Resultados: El análisis de secuencia de los cinco exones del gen no identificó variantes raras, pero se observaron diversas variantes de baja frecuencia. En el fenotipo restrictivo, observamos dos variantes nuevas (g.130delA y c.1740G>A, tres variantes sinónimas (rs57172732, rs55908624, rs74478645) y una variante sin sentido (L90F) considerada como deletérea y dañina.

En el fenotipo purgativo, identificamos dos variantes nuevas (g.295C> G y c.1725G>A), y el no sinónimo (c.1273A>TI425V), reportado como variante benigna. Interesantemente, observamos la variante 425V en tres pacientes con BN, la cual previamente se identificó en pacientes con un trastorno del espectro obsesivo-impulsivo.

Conclusión: Los resultados del estudio sugieren que cambios en la secuencia del gen *SLC6A4* están relacionadas con un posible daño o ganancia en la función de la proteína transportadora y podrían estar involucrados en la susceptibilidad a desarrollar anorexia nervosa restrictiva y bulimia nervosa purgativa; sin embargo, los hallazgos obtenidos deben considerarse como preliminares hasta que se repliquen en una muestra de mayor tamaño.

Palabras clave: fenotipo restrictivo; fenotipo purgativo; transportador de serotonina, secuenciación, *SLC6A4*; exones, variantes genéticas.

ABSTRACT

Background: Accumulating evidence indicates that alterations in the serotonin system are related to changes in eating behavior. The serotonin transporter is encoded by the *SLC6A4* gene and has been an interesting candidate for anorexia nervosa- restrictive type (AN-R) and bulimia nervosa (BN). Interestingly, functional variants have been identified in the coding region that could contribute to understand the role of this gene in eating disorders. The aim was to identify genetic variants in five exons of *SLC6A4* gene using Sanger-sequencing in anorexia nervosa-restrictive, bulimia nervosa patients, and a control group.

Method: The sample consisted of 86 patients and 50 control subjects. We obtained DNA samples from all subjects and performed Sanger-sequence analysis of the 1, 2, 3, 8 and 9 exons. The sequences were compared with the reference sequence of the *SLC6A4* gene.

Results: The sequence analysis of the five exons of the gene did not identify rare variants, but observed several low frequency variants. In the restrictive phenotype, we observed two novel variants (g.130delA and c.1740G>A), three synonymous variants (rs57172732, rs55908624, rs74478645) and a missense variant (L90F) reporting a probably deleterious and damaging variant.

In purgative phenotype, we identified two novel variants (g.295C>G and c.1725G>A), and the non-synonymous (rs28914832/I425V), reported as benign. Interestingly, we observed the 425V variant in three patients in the purgative phenotype, variant that previously was reported in patients with the obsessive-impulsive spectrum.

Conclusion: Our study suggests that variants in the gene sequence of the *SLC6A4* are related with a possible damaging or gain-of-function of protein transporter and may be involved in the susceptibility to develop anorexia nervosa restrictive and bulimia nervosa purgative. However, the present findings should be considered as preliminary until will be replicated in large samples.

Keywords: Anorexia Nervosa; Bulimia Nervosa; serotonin transporter; sequencing; *SLC6A4*; exon; genetic variants.

1. INTRODUCCIÓN

Los trastornos de la conducta alimentaria (TCA) y de la ingestión de alimentos son patologías en las que los patrones de consumo de alimentos se ven severamente alterados. Los TCA incluyen anorexia nervosa (AN), bulimia nervosa (BN) y trastorno alimentario no específicos (TANE´s) (DSM-IV). Los TCA son afectaciones complejas que suponen severas modificaciones de actitudes y conductas relacionadas con la ingestión de alimentos en respuesta a distorsiones perceptivas sobre las dimensiones corporales, así como el miedo fóbico a engordar. Este tipo de trastornos, se encuentran entre las enfermedades mentales de mayor letalidad en el mundo. En México se ha considerado un problema de salud pública, ya que su prevalencia se sitúa alrededor del 2-3% de la población femenina adolescente y juvenil. En México, los casos de TCA han aumentado exponencialmente, siendo la AN y BN más común en mujeres jóvenes adolescentes.

Hasta la fecha, no se conoce la etiología de los TCA; sin embargo, se sugiere que es un trastorno multifactorial, como resultado de una compleja interacción de factores predisponentes, precipitantes y perpetuántes, los cuales incluyen a factores socioculturales, psicológicos y biológicos (Strober et al., 2000). Se estima que los TCA tienen componentes heredables y se ha sugerido que juegan un papel importante en la etiología.

Diversos hallazgos reportan alteraciones en la neurotransmisión serotoninergica asociada a los TCA, como lo demuestran los estudios en modelos animales que reportan alteraciones del sistema serotoninérgico resultando en cambios de los estados emocionales y alteraciones en la señal de la saciedad (Duhault et al., 1993; Haleem D., 2009). El transportador de serotonina (5-HTT/SERT) es una proteína clave que se encarga de regular la disponibilidad de serotonina (5-HT) en el cerebro y mantener la homeostasis serotoninérgica. Estudios genéticos reportan que el gen del transportador de serotonina, el *SLC6A4,* es un candidato clave en el desarrollo de AN y BN. Nuestro grupo reportó previamente una variante rara y común asociada a AN y BN, otros hallazgos han identificado variantes raras que confieren ganancia o pérdida de función de la proteína (Camarena et al., 2012; 2018; Prassad et al., 2009). Resulta interesante identificar variantes en el gen *SLC6A4* en pacientes que presenten trastornos de la conducta alimentaria y en un grupo de controles sanos de la población mexicana.

2. ANTECEDENTES

2.1 Definición de los trastornos de la conducta alimentaria

Los trastornos de la conducta alimentaria son alteraciones en los patrones de la conducta alimentaria y causa un deterioro significativo de la salud física y el funcionamiento psicosocial (APA., 1994). Los TCA incluyen los diagnósticos de anorexia nervosa (AN), bulimia nervosa (BN) y TANE´s (figura 1) de acuerdo con los criterios diagnósticos del DSM-IVTR, utilizados para el diagnóstico de los pacientes en el estudio.

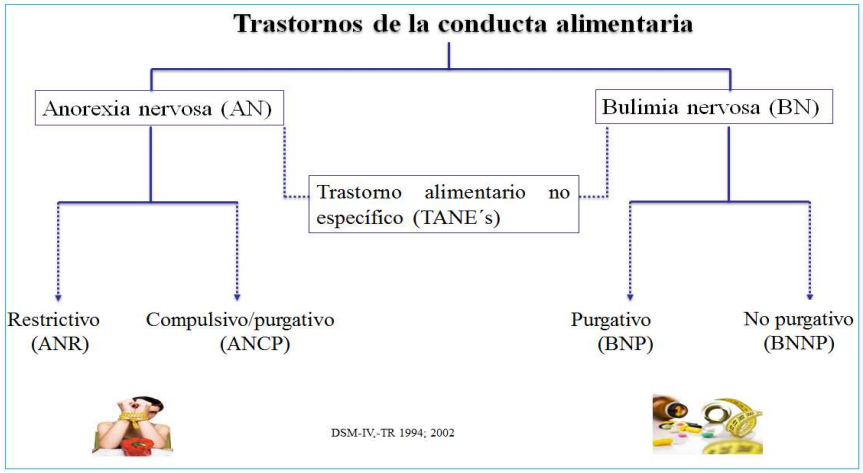

Figura 1. Clasificación de los trastornos alimentarios, de acuerdo a los criterios del DSM-IVTR. En la parte superior se incluyen a los diagnósticos principales de AN, BN y TANE´s. En la parte inferior, los subtipos diagnósticos de anorexia nervosa restrictiva (ANR), anorexia nervosa compulsiva purgativa (ANCP), bulimia nervosa purgativa (BNP) y bulimia nervosa no purgativa (BNNP).

Anorexia Nervosa (AN)

Se caracteriza por el rechazo a mantener el peso corporal igual o por encima del valor mínimo normal considerando la edad y la talla. También presentan miedo fóbico a ganar peso o convertirse en obeso, incluso estando por debajo del peso normal. Además, los pacientes presentan alteraciones de la percepción del peso o la silueta corporal, exageración en la autoevaluación o negación del peligro que representa un peso bajo y presencia de amenorrea. Se incluyen dos subtipos:

La anorexia nervosa restrictiva (ANR) se caracteriza en que el individuo no recurre regularmente a atracones, purgas o la provocación del vómito o uso excesivo de laxantes, diuréticos o enemas, además de que realizan ejercicio de forma compulsiva.

La anorexia nervosa compulsiva purgativa (ANCP), se caracteriza por realizar durante los últimos tres meses, episodios recurrentes de purgas, vómito auto provocado o utilización incorrecta de laxantes, diuréticos o enemas.

Bulimia nervosa (BN)

Se caracteriza por la presencia recurrente de atracones y purgas. La conducta de atracón se caracteriza por la sobre ingestión de alimento en un corto espacio de tiempo, menor a dos horas, acompañado de la sensación de pérdida de control sobre la ingesta de alimento (por ejemplo, sensación de no poder parar de comer o no poder controlar el tipo y la cantidad de comida que se está ingiriendo). Después se realizan conductas compensatorias inapropiadas de manera repetida con el fin de no ganar peso, como la provocación del vómito, uso excesivo de laxantes, diuréticos, enemas u otros fármacos. Los atracones y las conductas compensatorias inapropiadas tienen lugar como promedio al menos dos veces por semana durante un periodo de tres meses. Se identifican dos subtipos:

Bulimia nervosa purgativa (BNP): Se caracteriza por realizar conductas de autoinducción del vómito, uso de laxantes, diuréticos o enemas en exceso al menos tres veces por semana.

Bulimia nervosa no purgativa (BNNP): La persona presenta como principal forma de conducta compensatoria el uso de laxantes, diuréticos o enemas en exceso, no recurre a provocarse el vómito.

Cuando los elementos sintomáticos no son suficientes para integrar los diagnósticos mencionados, se clasifican como trastornos de la conducta alimentaria no específica (TANE´s) en seis tipos (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de los tipos de TANE´s de acuerdo al DSM-IV-RT

	Características
TANE 1	Cumplen los criterios diagnósticos para AN pero la menstruación es regular
TANE 2	Cumplen criterios diagnósticos para AN excepto que presentan un IMC> 17.5
TANE 3	Cumplen criterios para BN pero los atracones y pugas aparecen menos de 2 veces por semana o durante menos de 3 meses.
TANE 4	Empleo regular de conductas compensatorias inapropiadas después de ingerir pequeñas cantidades de comida
TANE 5	Masticar y expulsar, pero no tragar cantidades importantes de comida
TANE 6	Trastorno por atracón, presenta atracones recurrentes en ausencia de conductas compensatorias.

Cabe señalar que la salud de los pacientes con AN y BN se ve afectada por los diversos grados de desnutrición y desequilibrios fisiológicos, que producen diferentes

complicaciones, como la desnutrición; mientras que los vómitos auto-inducidos y el abuso de laxantes conllevan a complicaciones clínicas presentes en la anorexia y bulimia nervosa (tabla 2).

Tabla 2. Complicaciones clínicas en AN y BN

Desnutrición	Pérdida de peso excesiva IMC<16 Amenorrea primaria o secundaria Osteopenia/osteoporosis Disminución del volumen cerebral Piel escamosa
Vomito auto inducido	Reflujo gastroesofágico Deshidratación Hipotermia Desgaste del esmalte dental Gingivitis Hipertrofia parotídea
Uso de laxantes	Deshidratación Tolerancia al efecto laxante Acidosis metabólica
Abuso de diuréticos	Deshidratación Hipotensión arterial

Estudios clínicos han indicado la presencia de viraje en los subtipos diagnósticos dentro en los primeros cinco años de la enfermedad. Diversas investigaciones, reportan que entre el 20% y el 50% de las personas con ANCP desarrollarán con el tiempo BNP o BNNP y las estimaciones del cruce de BN a ANCP son bajas, con un 27%. De manera interesante, no se ha documentado el cruce de BN a ANR (Bulik et al., 2005; 2010; Eddy et al., 2008; Nishimura et al., 2008).

2.2 Fenotipos clínicos asociados en AN y BN

Los rasgos de la personalidad están constituidos por la identidad personal y se caracteriza por las distintas formas de percibir, de relacionarse, de pensar sobre el entorno y sobre uno mismo que se ponen de manifiesto en una amplia gama de contextos sociales y personales (Diaz-Marsá et al., 2000). En AN y BN se estima la presencia de alteraciones de la personalidad del 53 al 93% (Garner., 1993; Barajas et al., 2017).

Existen modelos conceptuales que sirven para describir las relaciones causales y correlacionales entre la personalidad y los trastornos alimentarios, como el modelo propuesto por Hollander et al., (1995) que describe un modelo conceptual de rasgos compulsivos-impulsivos, donde se ha descrito que hasta el 30% de pacientes con ANR presentan características compulsivas en su personalidad, aunado a rasgos de rigidez

cognitiva, persistencia, neuroticismo, evitación al daño, inhibición y perfeccionismo (Bulik et al., 2003; Caballero et al., 2003; Yilmaz et al., 2018). En cambio, los rasgos impulsivos son característicos de los subtipos de ANCP y BN, donde se ha descrito que hasta el 40% de los pacientes presenten el rasgo (Waxman S., 2009).

Compulsividad

Se define como la tendencia a realizar actos repetitivos, de manera habitual o ritualizada para prevenir el efecto negativo, como el miedo fóbico, la ansiedad y la evitación al daño, que conlleva al deterioro funcional como la extrema delgadez en la ANR (Chamberlain et al., 2005). Además, las compulsiones se centran en la alimentación, el peso y la forma del cuerpo, presentando pensamientos persistentes e intrusivos con respecto a la comida, el aumento de peso y el exceso de ejercicio compulsivo son características comunes, lo cual puede contribuir a la pérdida de peso. La inflexibilidad cognitiva y la atención excesiva a los detalles parecen regular la ansiedad y mantener conceptos complejos sobre la pérdida de peso (Chamberlain et al., 2018; Dalley et al., 2011; Finerberg et al., 2014; Flores y Romo., 2008).

De manera interesante, se ha desarrollado la escala de Yale-Brown-Cornell Eating Disorders scale (YBC-EDS), la cual es una entrevista que caracteriza y cuantifica las preocupaciones y rituales asociados a los trastornos de la alimentación (Thornton and Rusell., 1997). La escala ha servido como un elemento en la evaluación de la gravedad de los síntomas y deterioro asociado con las preocupaciones y rituales observados en pacientes con TCA (Mazure et al., 1994).

Impulsividad

De acuerdo con la definición de Zouk (2006), la impulsividad es un rasgo de personalidad complejo relacionado con la tendencia a realizar acciones motoras rápidas, no planeadas y con frecuencia ineficientes o incorrectas. Es también estudiado como un constructo dimensional de cuatro facetas: 1) urgencia positiva o negativa, definida como la tendencia a actuar de manera impulsiva cuando experimenta fuertes emociones; 2) falta de planeación, es la incapacidad para considerar las consecuencias de su comportamiento; 3) sensación de búsqueda, es el deseo de experimentar emociones; 4) dificultad para continuar con las tareas, es la incapacidad para persistir en actividades cotidianas (Cyders et al., 2007). La urgencia negativa ha sido asociada con los episodios de atracón y purga en BNP, como la pérdida del control de la ingesta alimentaría seguida

de conductas compensatorias (Claes et al., 2005; Forney et al., 2014; Hoffman et al., 2012). La impulsividad también se ha relacionado con conductas de autolesión, abuso de sustancias y conductas suicidas en BN (Fahy et al., 1993; Welch and Fairburn, 1996). Además, se describen rasgos de extraversión, estados de ánimo disfóricos y menor autodirección (Bulik et al., 2006; Cassin et al., 2005; Hollander el al 2000).

Perfeccionismo

Es un rasgo característico de AN, con un énfasis excesivo en los estándares autoimpuestos. El perfeccionismo patológico precede a la aparición de AN y se han asociado con una recuperación deficiente y menor duración de la remisión (Rigaud and Verges., 2007; Nilsson and Sundbom., 2008). Las personas con AN se caracterizan por tener altas expectativas irreales que aplican en situaciones académicas, profesionales y por supuesto en su conducta alimentaria; tratando de perder peso o evitar ganarlo. La personalidad perfeccionista podría ser un factor que contribuye a la restricción alimentaria persistente necesaria para mantener un cuerpo con muy bajo peso (Sassaroli et al., 2011). Cabe señalar, que diversas investigaciones han propuesto que el perfeccionismo, la insatisfacción corporal búsqueda de la delgadez, parecen ser un factor de mantenimiento para la psicopatología alimentaría como la restricción del consumo de los alimentos (Halmi et al., 2000; Lampard et al., 2011; Rigaud et al., 2011).

Evitación al daño

Se define como una tendencia a responder intensamente a señales de estímulos adversos, de ahí que se aprende a inhibir conductas para evitar el castigo, la novedad y la frustración. Es un rasgo de personalidad que se identifica en la ANR, ya que presentan inseguridad y son altamente desconfiados (Klump et al., 2000; Klefield et al., 1994). De forma interesante se reporta que la evitación al daño está de acuerdo con rasgos de sumisión y timidez, también se ha documentado una relación entre el aislamiento social y la falta de seguridad en la anorexia, lo que provoca dificultades en las relaciones sociales que se describen como una sensación paralizante de ineficacia personal, ausencia de asertividad y destaca la sumisión conductual (Bruch et al., 1982; Behar et al., 2006).

Emocionalidad negativa

La regulación de las emociones es un conjunto de procesos que utiliza el individuo para decrecer, mantener o incrementar uno o más aspectos de la emoción. Los procesos regulatorios de las emociones le permiten al individuo ejercer influencia en sentir que emociones presenta, como la experimenta y las expresa (Werner y Gross., 2010). De manera interesante, se ha sugerido que individuos con AN y BN presentan dificultades en el reconocimiento y la expresión de las emociones, mismas que subyacen a la desregulación emocional. En AN, se observa un pobre reconocimiento a los estados emocionales de enojo o alegría en comparación con sujetos control. En BN se reporta que las emociones negativas están asociadas con el impulso de realizar conductas de atracón con el fin de evitar sentir esa emoción que puede perturbar su estado de ánimo (Gianini et al., 2013; Tchanturia et al., 2015).

Neuroticismo

Se define como parte de la personalidad, que presentan estados de tensión y preocupación con tendencia a la culpabilidad (Eysench et al., 1964). En AN y BN parecen caracterizarse por presentar incrementado el neuroticismo, el cual está relacionado con la baja autoestima, la búsqueda de aprobación de la conducta y el miedo a la madurez durante la etapa de la adolescencia (Bulik et al., 1995)

Autodirección y cooperatividad

La autodirección y la cooperatividad son rasgos de la personalidad que se refieren a la capacidad de regular y adaptar el comportamiento a las demandas de una situación con el fin de lograr metas y valores elegidos personalmente (Cloninger et al., 1993). Se ha documentado que los individuos con ANR presentan mayor cooperatividad y menor autodirección en relación con BN, que presenta menor autodirección y cooperatividad (Vervaet et al., 2004).

2.3 Epidemiología en AN y BN

Los trastornos alimentarios han alcanzado en los últimos 30 años una especial relevancia, constituyendo un proceso patológico mayoritariamente identificado en la población femenina adolescente y juvenil. Tal relevancia se justifica por el aumento en su prevalencia, principalmente en las sociedades desarrolladas y occidentalizadas,

progresión que ocasionalmente ha sido etiquetada como *síndromes* (Hoek., 2003; Pike et al., 2014).

Diversas investigaciones en epidemiología han reportado de la incidencia a nivel mundial en AN, la cual ha pasado de 0.2 por cada 100,000 habitantes en la década de los sesenta, a 6.3 en el año 2000. En BN la incidencia se ha calculado de 5.5 por cada 100,000 habitantes en los sesentas y de 6.5 para el año 2000 (Hoek et al., 2016). Sobre la incidencia, prevalencia y mortalidad, se reporta que la AN tiene mayor mortalidad registrada entre los trastornos mentales del 54% de los pacientes a causa de complicaciones relacionadas con las conductas restrictivas y el 27% por suicidio. Diversas investigaciones han reportado incremento en la incidencia de AN en el grupo de mujeres entre 15 y 19 años; en Suiza se reporta la prevalencia de 1.9% y 4.3%; en Finlandia fue de 2.2%. En lo que respecta a BN se reportó la incidencia en Estados Unidos con el 2.9%; y en Europa varía entre 0.9% y 1.5% (Keski et al., 2007; Pelaez et al., 2007; Unikel et al., 2000). También se ha descrito la baja incidencia en hombres, que puede ser debido a que presentan una percepción corporal más real, mientras que las mujeres tienden a sobre-estimarse en la percepción corporal, aunado con la preocupación por el peso y la insatisfacción con su físico (Alcazar et al., 2011; Faus et al., 2015; Martínez et al., 2014; Pino et al., 2010).

La investigación epidemiológica en Latinoamérica reportó la prevalecía de AN en 0.1% y para BN se estimó en 1.16% (Kessler et al., 2013; Schooler et al., 2014; Warren et al., 2013; Kolar et al., 2016). En México, la tasa de prevalencia para adolescentes de 12 a 17 años se estimó en 0.6% para anorexia nervosa y de 1.8% para bulimia nervosa (Benjet et al., 2012; 2016). También se han identificado conductas de riesgo para la población, como son la preocupación excesiva por engordar, dietas restrictivas, uso de laxantes, el vómito auto-inducido y las actividades de ejercicio en exceso, lo cual pudiera conducir a factores de riesgo para el desarrollo de la AN y BN (Medina-Mora et al., 2003). Así mismo, se reportó que la edad promedio de inicio del padecimiento es de 15 años, sin diferencias estadísticas entre hombres y mujeres (Leon-Vasquez et al, 2017).

2.4 Etiología

El origen preciso de los trastornos de la conducta alimentaria no se ha podido dilucidar hasta el momento. Se han considerado diversas teorías sobre la etiología de los TCA, donde involucran múltiples factores tanto culturales, ambientales, biológicos y genéticos, que desempeñan un papel relevante en la génesis de los trastornos

alimentarios (Klump et al., 2001; Strober et al., 2000). Otras investigaciones, reportan que pudieran ser producto de causas psicopatológicas como la desregulación emocional y rasgos psicopatológicos (Garner and Bemis., 1982; Fairburn and Harrison, 2003; Stice et al., 2011). Se han propuesto diversos modelos que pudieran explicar de alguna manera la compleja etiología, como los modelos biopsicosociales, que combinan variables biológico-genéticas, psicológicas y sociales en una estructura causal. Garner et al., (1993) propuso el modelo etiológico de tipo biopsicosocial, compuesto por tres grandes factores: predisponentes, precipitantes y finalmente una vez establecido el trastorno alimentario, aparecen factores de mantenimiento del problema. La conjunción de factores culturales, familiares e individuales hará que una persona inicie una dieta estricta con el propósito de influir en su apariencia y que desencadenará en el inicio de los trastornos de la conducta alimentaria propuesto en el modelo biopsicosocial (Figura 2).

Los Factores predisponentes son aquellos condicionales que pueden contribuir a generar vulnerabilidad en la persona, entre ellos se destacan los factores individuales, familiares y culturales. En los factores individuales se refiere a los factores hereditarios que predisponen a la vulnerabilidad a desarrollar AN y BN, ya que se han encontrado que familiares de primer grado tienen mayor riesgo de desarrollarlos (Lilenfeld et al., 1998; Strober et al., 2000). Por otra parte, se alude a las características psicológicas de los individuos, como es el temperamento, el perfeccionismo patológico, la impulsividad y la excesiva necesidad de la aprobación externa.

Factores precipitantes: engloba elementos como la dieta restrictiva debido a exigencias sociales, también la ruptura del equilibrio familiar, la negligencia en la crianza genera inseguridad y baja autoestima (Gorwood et al., 2016; Strober et al., 2000).

Factores de mantenimiento (perpetuantes), son aquellos que, si permanecen intocables, prolongan la duración del trastorno o infieren el proceso de recuperación. Las dietas restrictivas o la sensación de no controlar el consumo de alimentos contribuyen a mantener el trastorno porque aumenta el miedo a ser obeso y refuerzan el sentimiento de incapacidad de mantener el trastorno alimentario. Se integran elementos como las conductas de autoinducción del vómito, el cambio en la fisiología intestinal, la percepción sobre el cuerpo, la personalidad y el énfasis en la cultura de la delgadez. En ocasiones, los familiares de primer grado realizan comportamientos que pueden perpetuar la

conducta, como la disparidad en la actuación de los padres durante el tratamiento, la incapacidad de los padres de familia para mantener sus decisiones durante el tiempo necesario, además de la negación de la situación y la ausencia de límites familiares (Bardone-Cone et al., 2008; Munro et al., 2017).

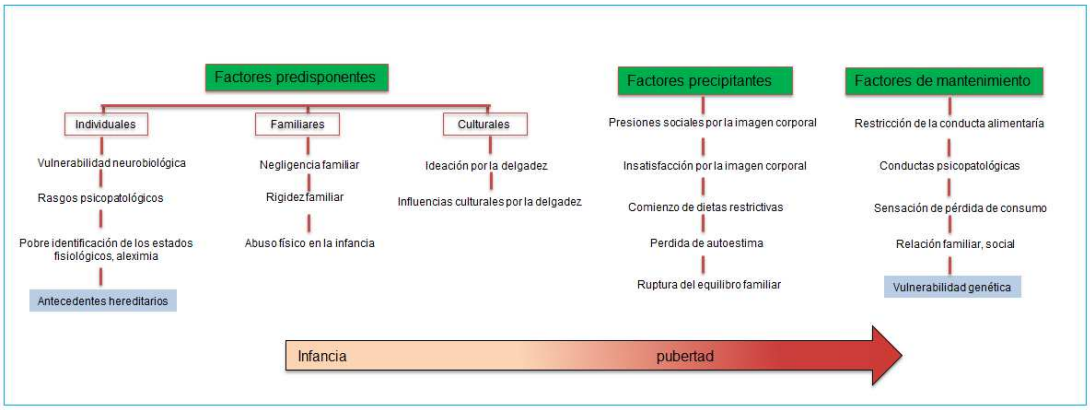

Figura 2. Modelo etiológico de tipo biopsicosocial en los TCA (Garner et al., 1993, modificado). En la parte superior se encuentran los factores predisponentes, precipitantes y de mantenimiento. En la parte inferior, se encuentran los elementos que integran a cada factor. La flecha roja indica la trayectoria del desarrollo del individuo.

3. Conducta alimentaria

Se define como el comportamiento normal relacionado con los hábitos de alimentación, la selección de alimentos que se ingieren, las preparaciones y las cantidades ingeridas de ellos, además involucra la fisiología del apetito y la saciedad.

El apetito se refiere al conjunto de señales internas y externas que guían a un individuo en la selección e ingestión de alimentos; además, involucra la conducta motivacional hacia los alimentos, la cual se activa al aumentar la utilización de las reservas energéticas. La ingestión de alimentos lleva a equilibrar el gasto de energía debido al metabolismo basal, al ejercicio voluntario y la termogénesis. Además, el estado motivacional hacia la búsqueda del alimento, se cree que está controlado por procesos regulatorios homeostáticos para asegurar la supervivencia. La motivación es entonces el impulso hacia realizar una acción basada en lo que el organismo necesita como la necedad de la búsqueda de los alimentos.

La saciedad es la sensación fisiológica de plenitud que determina el término de la ingesta alimentaria. Dado que uno de los objetivos principales de la regulación de la ingesta alimentaria es el control del peso corporal, hay señales que integran la regulación

de la ingestión de alimentos con señales provenientes de las reservas corporales, especialmente de energía (leptina) traduciéndose en la manutención del peso corporal (Mela., 1996).

3.1 Función del hipotálamo en el control de la ingesta de alimentos

El hipotálamo es un área del cerebro ubicado en el área ventral del diencéfalo del tercer ventrículo, donde se regulan funciones básicas como el equilibrio electrolítico, temperatura corporal, actividad de la reproducción, respuesta energética, ingesta alimentaria, la digestión y establece la sensación de saciedad.

Los núcleos primarios del hipotálamo que participan en las conductas de alimentación y la saciedad lo constituyen el núcleo arcuáto (ACR) (Figura 3), el cual contiene dos conjuntos interconectados de neuronas de primer orden que participan en el control del hambre y la saciedad, como 1) el neuropeptido Y (NPY) y el péptido relacionado con agutí (AgRP), los cuales inducen la señal de hambre; 2) el otro conjunto de neuronas son la propiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART), los cuales expresan la señal de saciedad. Además, existen señales aferentes como la ghrelina (intestino), la insulina (páncreas) y la leptina (tejido adiposo) que impactan sobre las sensaciones de hambre y saciedad, ya que se unen a receptores de las neuronas orexigénicas y/o anorexigénicas del ARC y los efectos de estas interacciones péptido-hormona-receptor son la liberación de los NPY y AgRP o los neuropetidos anorexigénicos (Tabla 3).

Los neuropeptidos del ARC viajan a lo largo de los axones hasta las neuronas de segundo orden, que se localizan en el núcleo paraventricular (NPV) y es el área responsable de la integración e interpretación de diferentes señales periféricas y centrales que traen información sobre las condiciones microambientales que rodean al hipotálamo. En el NPV recibe conexiones de otras áreas hipotalámicas como el núcleo lateral (HL) de los núcleos arqueado y dorso medial (DM) y expresan receptores para péptidos que activan la conducta alimentaria (orexigénicos) o la inhiben (anorexigénicos). Además, en el NPV recibe señales aferentes que vienen del tallo cerebral, principalmente la noradrenérgicas, NPYergicas del locus *coeruleus* y de vías serotoninérgicas que llegan de los núcleos de rafe, como la serotonina (5-HT), el cual es un neurotransmisor que está encargada de inducir la respuesta de saciedad (Lee et al., 1998; Schwartz et al., 2000). Otro neurotransmisor que se encuentra relacionado con la ingesta es la noradrenalina

(NE), la cual es sintetizada en el complejo vagal dorsal y estimula la ingesta de alimentos mediante la activación del receptor α2, mientras que la estimulación de receptores β2 y β3 tienen efecto opuesto. Existe otro neurotransmisor, la dopamina (DA), la cual depende de los numerosos subtipos de receptores y los sitios de acción del cerebro sobre la ingesta. La señalización de DA parece suprimir la ingesta de alimentos en ARC y LHA. Además, las vías mesolímbicas parecen estar asociadas a los efectos gratificantes de los alimentos ricos en azúcares a través de la activación del receptor del subtipo D5 (Pothos et al., 1995). Finalmente, el NPV proyecta sus axones hacia regiones cerebrales que incluyen al tálamo, la amígdala, la corteza insular, corteza orbito-frontal y el núcleo accumbens involucradas en el control del peso corporal, la percepción de características sensoriales de los alimentos en las tareas de planeación y ejecución de la búsqueda hacia los alimentos (Lee et al., 1998; Pothos et al., 1995; Schwartz et al., 2000).

El hipotálamo lateral (HL) es otra región que regula el consumo de alimentos a través de la expresión y liberación de péptidos como la hormona liberadora de corticotropina CRH, sus acciones están mediadas por dos receptores que activan la adenilato ciclasa, CRH-RI y CRH-R2. Las neuronas del CRH envían sus axones hacia el NPV a través de su receptor CRH-R2, e inhiben la motivación por la ingestión de alimentos, por lo que tiene propiedades anorexigénicas (Valassi et al., 2008).

Tabla 3. Sustancias que se encuentran regulando la conducta alimentaria

Efecto Orexigénico	Efecto Anorexico
Neuropeptido Y (NPY)	Proopiomelanocortina (POMC)
Proteína relacionada con Agouti (AgRP)	Hormona liberadora de corticotrofina (CRH)
Orexina (Orex)	Hormona liberadora de tirotrofina (TRH)
Ghrelina	Colecistoquinina (CCK)
	Transcriptor relacionado con cocaína y anfetaminas (CART)
	Serotonina (5-HT)
	Hormona Melanocortina (MSH)

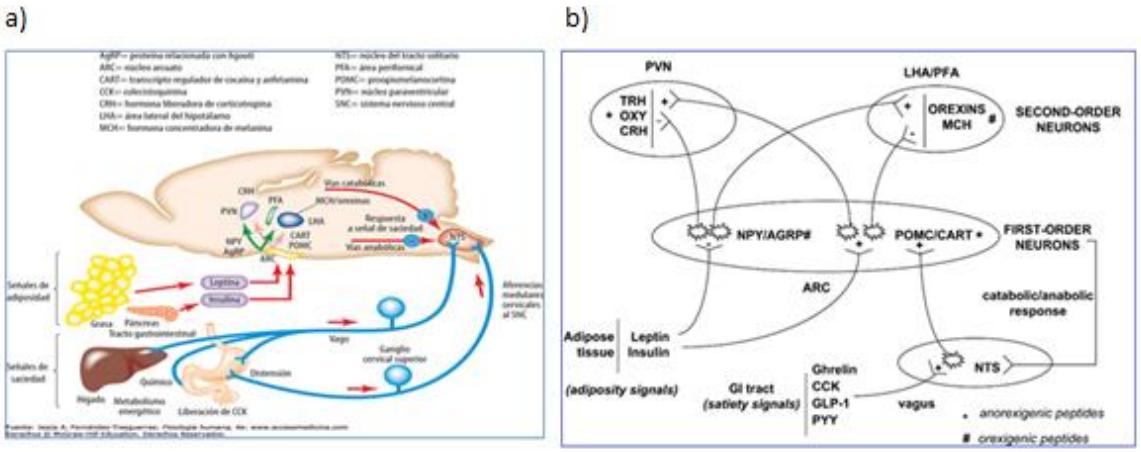

Figura 3. Vías neurobiológicas relacionadas con la conducta alimentaria. La figura (a) se encuentran las vías periféricas de la señal de hambre y saciedad en los núcleos del hipotálamo. En la figura (b) se encuentran las neuronas de primer orden en el área del núcleo arcuato que incluyen las neuronas anorexigenicas y orexigénicas y las neuronas del segundo orden en el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo lateral (LHA).

3.2 Neurobiología de la AN y BN

Estudios neurobiológicos han aportado información sobre disfunciones en los procesos neuronales relacionados con el apetito y los estados emocionales en AN y BN (Kaye et al., 2009; 2013). Los investigadores sugieren que los pacientes con AN se caracterizan por alteraciones en regiones cerebrales, como la orbito-frontal, amígdala y el área del núcleo de rafe que pueden conferir vulnerabilidad para los comportamientos alimenticios desregulados. Además, el comportamiento de autocontrol en los pacientes con AN, puede ser producido por un funcionamiento exacerbado del circuito cognitivo dorsal y orbito-frontal, que les permite inhibir el apetito. Otros hallazgos, reportan sobre la alteración en la funcionalidad de los neurotransmisores de monoamina relacionados con la conducta alimentaria y las emociones (Kaye et al., 1984; 2009; Steiger et al., 2004).

El neurotransmisor 5-HT ha sido ampliamente investigado en los trastornos alimentarios, donde se ha documentado sobre la disminución de la densidad del 5-HT en el núcleo de rafe y la corteza pre-frontal en pacientes con ANR, cuando se compara con el grupo control (Kaye et al., 2013), otros hallazgos también reportan sobre la alteración en la densidad del transportador de serotonina (5-HTT) (Bailer et al., 2007; Yokokura et al., 2019). Además, se ha estudiado el triptófano que es un aminoácido esencial y es precursor del 5-HT, en estados de desnutrición en AN se reportan bajos niveles a niveles plasmáticos (Kaye et al., 2003). Otros hallazgos, reportan que el neuro-circuito ventral

límbico, que incluye la amígdala y la región ventral de la corteza que se relaciona con las emociones, se encuentran lesionados en pacientes con AN (Kaye et al., 2008) y se ha documentado sobre la disminución de materia gris y blanca en la región ventral límbico (Korneich et al., 1991; Seltz et al., 2013).

Con respecto a las investigaciones realizadas en BN han documentado sobre alteraciones en la vía serotoninérgica, debido a las conductas de ayunos prolongados, seguidos por atracones y conductas compensatorias. La actividad de la 5-HT en el lóbulo orbito-frontal se ha asociado con la desinhibición conductual y los extremos de autocontrol, lo que ha llevado a proponer que presentan reducciones del 5-HT en estás aéreas vinculadas con la conducta purgativa (Kaye et al., 2008; Tucker et al., 1995). Otros estudios, informaron sobre las alteraciones en la densidad del 5-HTT en la corteza orbito-frontal en pacientes con BNP (Koskela et al., 2007; Tauscher et al., 2001). De manera interesante, se reportó que pacientes recuperados de BN presentaban disminución de la densidad del 5-HTT en áreas del mesencéfalo, cíngulo superior y la región temporal superior (Frank et al., 2001; Pichika et al., 2012).

Dado el papel que desempeñan los receptores serotoninergicos en la modulación de la conducta alimentaria, se ha documentado alteraciones en la funcionalidad en AN y BN. Como el receptor presinaptico 5-HT_{1A}, localizado en el núcleo de rafe, donde participa en la disminución de la neurotransmisión del 5-HT. Se ha reportado que pacientes con AN y BN presentan entre un 50 y 70% de incremento en la densidad del receptor 5-HT_{1A} (Galusca et al., 2008; Bailer et al., 2011). Respecto a los receptores 5-HT_{2A} postsinápticos se encuentran en altas densidades en la corteza cerebral y participa en la señal de saciedad, se ha reportado que individuos recuperados de ANR tenían reducido el receptor en áreas de la corteza orbito-frontal, parietal y temporal (Frank et al., 2002); con respecto a BN se reportó que el 5-HT_{2A} presentó densidades normales en la corteza orbitofrontal (Andenaert et a., 2003; Frank et al., 2002; Goethais et al., 2004) (Tabla 4).

Tabla 4. Estudios de imagen cerebral realizados en pacientes con AN y BN

Autores	Método	Muestra	Corteza orbito-frontal	Temporal/ Amígdala	Corteza Cingulada	Corteza Parietal	Núcleo de rafe
			Receptor 5-HT1A				
Galusca, 2008	PET	AN=8	Incrementado	Incrementado		Incrementado	
Galusca 2008	PET3	Rec AN=9	incrementado	incrementado		Incrementado	
Bailer, 2011	PET	Rec BN=13		Incrementado	incrementado	incrementado	
			Receptor 5-HT2A				
Audenaert, 2003	SPECT	AN=15	disminuido	normal			
Frank, 2002	PET	Rec AN=16	normal	disminuido	disminuido	normal	
Goethals, 2004	SPECT	BN=10	normal	normal	normal	normal	
			Transportador de 5-HTT/SERT				
Bailer, 2007	PET	AN=11	incrementado				incrementado
Yokokura, 2019	SPECT	ANR=12					disminuido
Koskela., 2007	SPECT	BNP=13	incrementado				
Tauscher., 2001	SPECT	BN=10	disminuido				

PET: Tomografía por emisión de positrones. SPECT: Tomografía computarizada de emisión de positrones

3.3 Hipótesis serotoninérgica en AN y BN

Hipótesis serotoninérgica en AN

Estudios clínicos han respaldado la hipótesis de la disfunción en el sistema serotoninérgico en la AN. De acuerdo con evidencias clínicas y biológicas, Steiger (2004) planteo que ANR coincide con el incremento en el tono serotoninérgico en áreas del núcleo paraventricular y prefrontal. También, se ha documentado sobre la desregulación emocional en la ANR, la cual se encuentra asociada con el incremento del tono serotoninérgico, lo que contribuye a la desregulación de los patrones de consumo alimentario (Compan et al., 2012; Kaye et al., 1991; 2009). De forma interesante, se ha documentado que durante la fase crítica de la enfermedad, los pacientes que presentan severa desnutrición presentan baja densidad del 5-HT, sin embargo, cuando son recuperados se reporta incrementado el metabolito de 5-HT (5-hidroxindolacético, 5-HIAA), también se reporta sobre la disminución de la densidad del triptófano durante los estados severos de desnutrición (Kaye et al., 1984; 2001; 2003).

En un hallazgo, se reportó que la actividad serotoninérgica coincide con las dietas estrictas que realizaron un grupo de mujeres sanas y reportaron la disminución de los niveles séricos de triptófano y 5-HT medido en plasma (Anderson et al., 1998).

En estudios de imagen cerebral se han reportado alteraciones en las densidades de los receptores serotoninergicos, como el 5-HT_{1A} que se encuentra aumentado y por el

contrario el 5-HT_{2A} se encuentra disminuido en pacientes con AN (Frank et al., 2002). Otros hallazgos, informaron sobre las alteraciones del transportador de 5-HTT/SERT en áreas relacionadas con el hipotálamo y el tálamo, donde se reportó que pacientes recuperadas de ANR presentaban disminución de la 5-HTT en comparación con ANCP y BN (Bailer et al., 2007; Borgers et al., 2014).

Un reciente hallazgo, reportó que pacientes con ANR presentan disminución de la densidad del receptor 5-HTT en las áreas del mesencéfalo dorsal, el hipotálamo y el núcleo de rafe, sugiriendo una posible hipofunción del receptor 5-HTT en la sinapsis serotoninérgica, lo cual apoya la hipótesis de un mayor tono serotoninérgico en ANR (Yokokura et al., 2019).

Además, se ha especulado que la distorsión de la imagen corporal, que es un síntoma en la ANR, pudiera estar relacionado con procesos de memoria deteriorados que pueden estar asociados con alteración de la señal serotoninérgica, especialmente en las regiones de la corteza cingulada, tálamo y cuerpo estriado que están relacionados con la memoria a largo plazo (Yokokura et al., 2019).

Por otra parte, se ha documentado sobre la vulnerabilidad genética en la ANR, donde se han identificado variantes raras y comunes en genes del sistema serotoninérgico que pueden conferir vulnerabilidad en la homeostasis serotoninérgica y la alteración en la desregulación emocional, lo que podría conferir vulnerabilidad biológica al desarrollo de la ANR (Ando et al., 2001; Calati et al., 2011; Kiezebrik et al., 2010; Rybakowsky et al., 2006; Steiger., 2009; 2011).

Hipótesis serotoninergica en BN

En BN existe evidencia que apunta a una desregulación de los procesos serotoninérgicos, como la respuesta de prolactina a los agonistas del receptor de serotonina la meta-clorfenilpiperazina (m-CPP), 5-hidroxitriptofano y difenfluramina. Se ha planteado que existe alteración del tono serotoninérgico por el agotamiento del triptófano en la dieta; también se ha relacionado con una mayor ingesta de alimentos e irritabilidad del estado del ánimo en los individuos con BN cuando se les compara con sujetos sanos; sugiriendo una actividad serotoninérgica alterada, el cual puede ser causado por reducciones en los suministros dietéticos del aminoácido triptófano o por otros efectos de la desnutrición en los sistemas de neurotransmisores (Goldbloom and Garfinkel., 1990). Además**,** se han reportado alteraciones en las concentraciones del metabolito a 5-HT, el 5-HIAA, en individuos recuperados de BN. También se ha reportado que sujetos

recuperados de BN presentaron una reducción de la densidad plaquetaria (3H-) que se cree que es un marcador periférico de la actividad de los transportadores de 5-HT (Jimerson et al., 1992; Tauscher et al., 2001; Steiger et al., 2005), produciendo una hipersensibilidad de receptores post-sinápticos en respuesta a la disminución de la densidad del 5-HT en el espacio sináptico. Sin embargo, las conductas de atracón provocan el incremento de la disponibilidad de triptófano en el cerebro lo cual incrementa la síntesis de 5-HT (Kaye et al., 1998; 2000; Smitt et al., 1999).

Steiger (2004) reportó que la bulimia nervosa en estado activo se asocia con un bajo tono serotoninérgico en la neurotransmisión debido a las conductas de purga que caracteriza a la BN, ya que los pacientes que presentan un episodio de purga reportan disminución de los niveles del metabolito de 5-HT, así como una reducción de la actividad del transportador de 5-HTT/SERT.

Por otra parte, el paradigma de la disminución de 5-HT durante los episodios de ayuno prolongado puede exacerbar los síntomas psicopatológicos de impulsividad y bajo control de los impulsos, lo que los lleva a realizar los episodios de atracón y purga. En cuanto a los rasgos de impulsividad y agresividad, se han relacionado con una disminución del tono serotoninérgico en los pacientes con BN (Calati et al., 2011; Jimerson et al., 1997; Kiezebrink et al., 2010; Rinne et al., 2000; Steiger et al., 2004). En el planteamiento de la hipótesis serotoninérgica, se han reportado alteraciones en vías de señalización, en particular en el 5-HTT, que es una molécula clave encargada de mantener la homeostasis serotoninérgica, y su alteración pudiera estar asociada a conferir vulnerabilidad biológica a AN y BN (Tabla 5).

Tabla 5. Hipótesis serotoninérgica en AN y BN

	Anorexia nervosa	Bulimia nervosa
Estado fisiológico	Mayor tono 5-HT (señal saciedad) (Steiger H. 2004) Disminución triptofano hidroxilasa en plasma (Kaye et al., 2003). Disminución del metabolito 5-HIAA (Kaye et al., 1998).	Menor tono 5-HT (después de las purgas) (Steiger H., 2004) Alteración de TPH (Kaye et al., 2003) Alteración 5-HIAA (Kaye et al., 2003)
Rasgos psicopatológicos	Neuroticismo, evitación al daño (Lavender et al., 2015) Perfeccionismo, rigidez cognitiva (Sassaroli et al., 2011) Conductas obsesivo-compulsivo (Flores-Romo et al., 2008) Estados emocionales negativos (Klump et al., 2000)	Disforia, sensación de pérdida de control del consumo de alimentos (Forney et al., 2014) Impulsividad (Bulik et al., 2006) Estados emocionales negativos (Tchanturia et al., 2015)
Alteración en áreas cerebrales	Disminución de la densidad del SERT en hipotálamo y en el núcleo de rafe (Bailer et al., 2011) Hipofuncionalidad del SERT (Yokokura et al., 2019) Aumento del receptor 5-HT_{1A} Disminución del $5HT_{2A}$ (Galusca et al., 2008; Frank et al., 2002)	Disminución de 5-HT en corteza-prefrontal parietal (Cools et al., 2008) Alteración de SERT (Tauscher et al., 2001) Disminución del receptor $5HT_{1A}$ (Bailer et al., 2011)
Modelos en murinos Agonistas 5-HT (bufotenina)	Ratones knockout SERT: peso bajo y muerte prematura (Chen et al., 2012)	Estados de estrés y sobre ingesta de alimentos (Hardaway et al., 2015)
Estudios genéticos	Estudios de Exoma, GWAS en AN (Bienvenu et al., 2019; Watson et al., 2019) Estudios de asociación de 5-HTTLPR, G56A VNTR, intrones del gen *SLC6A4* (Camarena et al., 2012; 2018; Munn-Chernoff et al., 2012)	Estudios de asociación del 5-HTTLPR asociada a BN (Camarena et al., 2018; Monteleone et al., 2006)

4. Transportador de serotonina (SERT, 5-HTT)

Es sabido que la comunicación intracelular en el sistema nervioso central es impulsada por la liberación y recaptación de neurotransmisores en la sinápsis y la duración de los neurotransmisores liberados en el espacio sináptico, está regulado por un grupo de transportadores de soluto, localizados en las neuronas y células gliáles. Los transportadores SLC6, son dependientes de Na^+ y Cl^-, e incluyen a la: serotonina (5-HT), dopamina (DA), y noradrenalina (NA). Los transportadores se distinguen de los canales, ya que median el movimiento de los iones y moléculas a través de la membrana. Los transportadores presentan especificidad para la molécula que transporta, así como la cinética definida en el proceso de transporte. La familia de transportadores de soluto son activos secundarios que utilizan un gradiente quimio-osmótico de Na^+ para acoplar el transporte descendiente de Na^+ y Cl^- con el transporte ascendente de sus sustratos a través de la membrana. Las divisiones funcionales de la familia SLC6 coinciden con las agrupaciones observadas en el análisis filogenético (Figura 4). Los transportadores han sido asociados a una serie de enfermedades complejas en humanos que hacen de esta

familia un objetivo crítico para su estudio, además varios miembros de esta familia están directamente involucrados como blancos terapéuticos en los tratamientos farmacológicos.

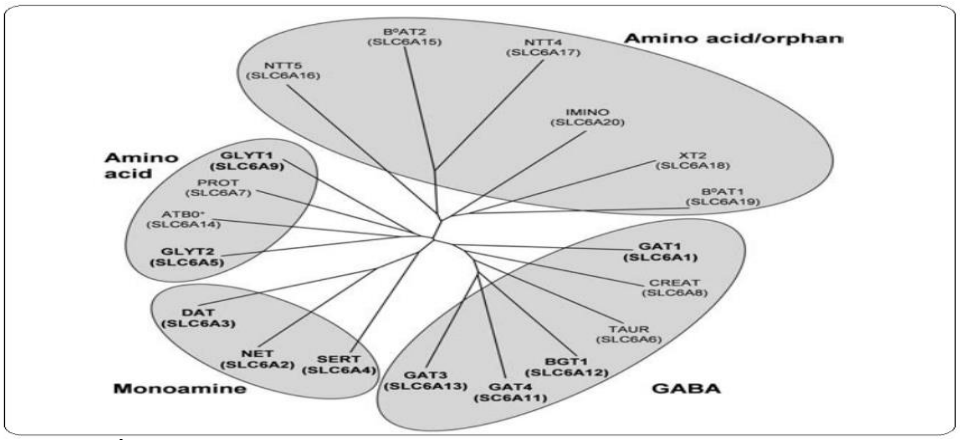

Figura. 4. Árbol filogenético de los miembros de la familia SLC6 (Tomado de Kristensen et al., 2011. Pharm. Rev. 63(3):658). La rama de transportadores de GABA (taurina, creatinina betaina). La rama de transportadores de aminoácidos I (glicina, prolina) La rama de transportadores de aminoácidos II (transportadores de aminoácidos epitelial y cerebral). La rama de transportadores de monoamine (dopamina, serotonina y noradrenalina).

En los eucariotas, los SLC6 se han caracterizado por desempeñar papeles relevantes en el transporte de aminoácidos, la modulación y señalización de los neurotransmisores en el sistema nervioso central y periférico (Pramod et al., 2013; Kristensen et al., 2011). La proteína SERT se distribuye en los cuerpos celulares y las dentrítas de los núcleos de rafe, así como a lo largo de las fibras que atraviesan la región del prosencéfalo en el cerebro. La proteína se localiza preferentemente en el espacio presináptico en las terminales axonales (Quian et al., 1995; Tao-Chen and Zhou., 1999) y también se encuentran en células especializadas en el almacenamiento o inactivación sistémica de 5-HT, incluidas las células especializadas del intestino, placenta, plaquetas y linfocitos sanguíneos (Faraj et al., 1994; Gordon and Barnes., 2003). El transportador de 5-HTT/SERT tiene la función principal de reciclar el 5-HT del espacio sináptico y mantener la homeostasis serotoninérgica con los receptores post-sinápticos (Figura 5).

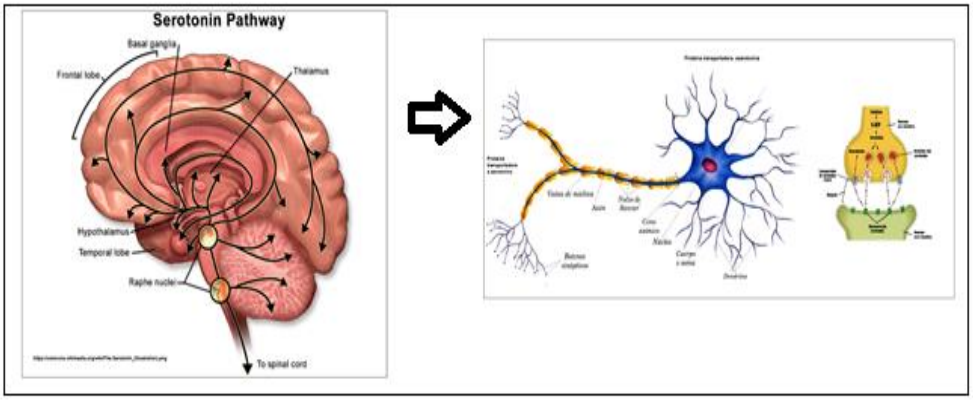

Figura. 5. Distribución de la familia de la localización de los transportadores SLC6 en humanos. En la imagen izquierda se encuentra la vía de señalización serotoninergica en el cerebro. En la imagen derecha se encuentra la neurona sináptica, donde se localiza la proteína SERT en el espacio pre-sináptico.

4.1 Estructura del transportador de serotonina

La identificación de la estructura de alta resolución del transportador de leucina bacteriana SLC6 LeuT, han proporcionado un marco para interpretar la estructura y función de SLC6 (Yamashita et al., 2005). Las proteínas SLC6 tienen 12 dominios membranales (TM) hidrofóbicos con terminales NH_2 y COOH citoplamáticas terminales. Las transmembranas 3 y 4 están separadas por una gran asa hidrofílica que lleva dos sitios canónicos para la glicosilación. SERT contiene además sitios potenciales de fosforilación para varias quinasas (Hoffman et al., 1991; Ramammorthy and Bauman., 1993).

La estructura de LeuT TM-10 se divide en dos dominios, un paquete de cuatro hélices (TMs 1, 2, 6 y 7) y un andamio (TMs 3-5 y 8-10). El asa de cuatro hélices se sitúa en un ángulo con respecto al andamio, empacando en conformaciones orientadas hacia el exterior, de cerca contra el andamio en el lado citoplasmático del sitio de unión y separándose del andamio en el lado extracelular para crear la vía extracelular. En los modelos de la estructura abierta hacia el interior y las estructuras de otros miembros de la familia, el eje de inclinación del haz se invierte, lo que sugiere un mecanismo de balanceo que cierra la vía extracelular y abre un camino hacia los sitios de unión y el citoplasma. Todas las estructuras de la familia son consistentes con el cambio conformacional que implica el movimiento del haz con relación al andamio y poco cambio dentro del andamio (Forrest et al., 2008; 2009).

Las diferencias entre estructuras y modelos abiertos plantean la cuestión de cómo se propagan los cambios en los trasportadores SLC6, donde se ha podido explicar la apertura de la vía extracelular con cierre recíproco de la vía citoplasmática y se ha propuesto que las hélices largas de las TMs 2 y 7 pudieran servir para transmitir cambios conformacionales entre las vías extracelulares e intracelulares dentro del asa; sin embargo, la estructura de LeuT abierta hacia adentro sugiere que la vía citoplasmática se abre cuando la mitad citoplasmática de TM1 oscila lejos del resto del asa helicoidal (Krishnamurty et al., 2012).

4.2 Regulación fisiológica del transportador de serotonina

La principal vía catabólica para la excreción del 5-HT es la desanimación oxidativa por la monoamino oxidasa (MAO), dando origen a su principal metabolito inactivo, el 5-HIAA. Todas las enzimas que intervienen en la degradación de 5-HT están localizadas a nivel intracelular, lo que requiere la recaptación previa de 5-HT por las células para proceder a su posterior inactivación (Fuller et al. 1990).

Por otro lado, la disponibilidad de la proteína en la superficie de la membrana se ve comprometida por la red de señalización que involucra quinasas y fosfatasas, que influyen en gran medida a la presencia de SERT en la superficie celular. Los estudios de transfección realizados en células HEK-293, han demostrado que la proteína SERT es dependiente de la activación de la proteína Kinasa C (PKC), donde se observó reducción de absorción del sustrato en la superficie de la membrana, durante la internalización interviene una cascada de señalización como la proteína kinasa G (PKG) que estimula la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno p338MAPK y en conjunto catalizan la actividad de SERT hacia la superficie de la membrana celular, apoyado por la molécula Sintantina 1A (Syn1A), así mismo, la fosforilación intracelular puede hacer lento el reciclaje de SERT hacia la superficie o bien puede redirigir los eventos del tráfico intracelular que contribuyen a los cambios en la expresión de la superficie de SERT (Ramamoorthy et al., 1999). De manera interesante, se ha observado que en la estructura secundaria de SERT, los residuos de serina y treonina en las terminales NH_2 y COOH citoplamáticas, aumenta la velocidad de actividad de SERT, por la afinidad de unión con la Syn1A y la PKG (Braundry et al., 2019; Jayanthi et al., 2005; Ramamoorthy et al., 2011).

De manera interesante, los fármacos, pueden ser reguladores externos sobre la proteína SERT, donde se ha observado la inhibición no competitiva del transporte de

sustrato con cristales de LeuT y varios antidepresivos tricíclicos e inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT ISRS. Ya que los bloqueadores no competitivos se unen a un sitio de unión vesicular extracelular que es el sitio S2 de LeuT (Singh et al., 2007; Zhou et al., 2009).

Se ha propuesto que variantes raras y comunes en el gen del transportador de serotonina *SLC6A4* pueden alterar la funcionalidad de SERT y ver comprometida su homeostasis serotoninérgica en el cerebro (Hu et al., 2006; Prassad et al., 2009).

4.3 Gen del transportador de serotonina *SLC6A4*

El gen en humanos es el *SLC6A4*, que codifica para el transportador a serotonina, es una región de 40 kilobases (kb), localizado en el cromosoma 17q11.2 que se compone de catorce exones y 13 intrones, abarcando una región de 37.8 Kb (Ramamoorthy et al., 1993) (Figura 6). La secuencia predice una proteína de 630 aminoácidos, contiene doce dominios transmembranales (Lesch et al., 1994; Murphy et al., 2011).

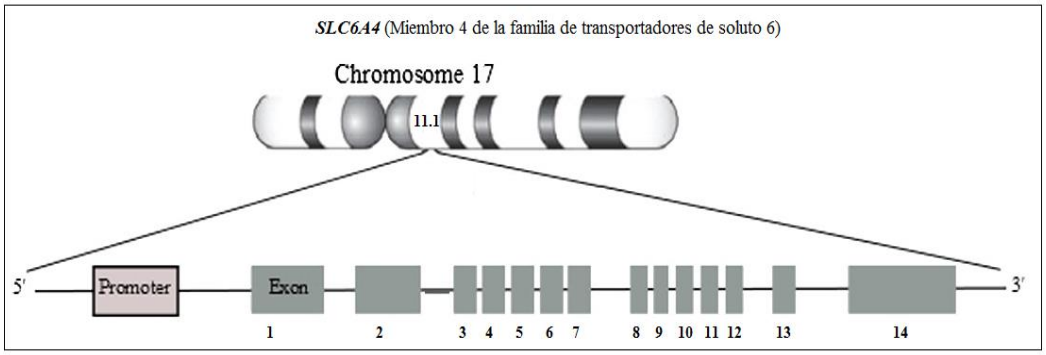

Fig. 6. Localización del gen *SLC6A4* en humanos (Tomado de Porcelli et al., 2012. Eur.Neurpsych. 22(4):239-258). El gen se localiza en el cromosoma 17q11.1. El gen tiene 14 exones, una región promotora y la región no traducida 5´ y 3´.

Splicing alternativo de los exones 1A y 1B

Los exones 1A y 1B son exones que actúan como *splicing* alternativo ya que regulan la expresión tejido-específica del transportador, la variante de *splicing* que posee solamente el exón 1A dirige la expresión preferencial en el tejido del sistema nervioso central (SNC), médula adrenal y corazón, expresadas en niveles similares (Bladley et al., 1997; Ozarac et al 2002).

El proceso de escisión o separación de estos intrones de los pre-mRNAs se denomina splicing constitutivo e implica la participación de una compleja maquinaria denominada espliceosoma (spliceosome), formada por 5 RNAs pequeños en forma de

ribo-núcleo proteínas (snRNPs) y más de 150 proteínas accesorias. Sin embargo, en numerosos casos este proceso se modula de forma selectiva combinando sólo algunos de los exones disponibles, en un proceso denominado splicing alternativo. Proceso por el cual, el pre-mRNA que contiene todos los intrones y exones de un gen se genera uno o varios mRNAs con un determinado patrón de exones. Esta exclusión/inclusión de exones es un proceso regulado de forma selectiva, cuya finalidad es generar versiones de RNAs y proteínas con diferentes características y funciones (denominadas isoformas) y así amplificar la capacidad funcional y/o codificante del genoma (Kornblihtt et al., 2013).

4.4 Variantes genéticas del *SLC6A4* con cambios en la función de la proteína

En el gen se han identificado diversas variantes comunes y raras en la región del promotor, una de las más estudiadas es una inserción/deleción de 43 pares de bases, lo que le confiere cambios en la expresión de la proteína transportadora a serotonina 5-HTT/SERT (Heils at al., 1996; Hu et al, 2006). Otros estudios identificaron variantes raras en la inserción (alelo L), donde un SNP (rs25531), que consiste en un cambio de Adenina por Guaina, ha demostrado tener un papel relevante en la actividad transcripcional diferencial (Hu et al., 2006). Así mismo, se reportó otro SNP (rs25532) que consiste en el cambio de Timina por Citosina, en donde demostraron que el alelo T disminuye la actividad transcripcional de la molécula (Wendland et al., 2006).

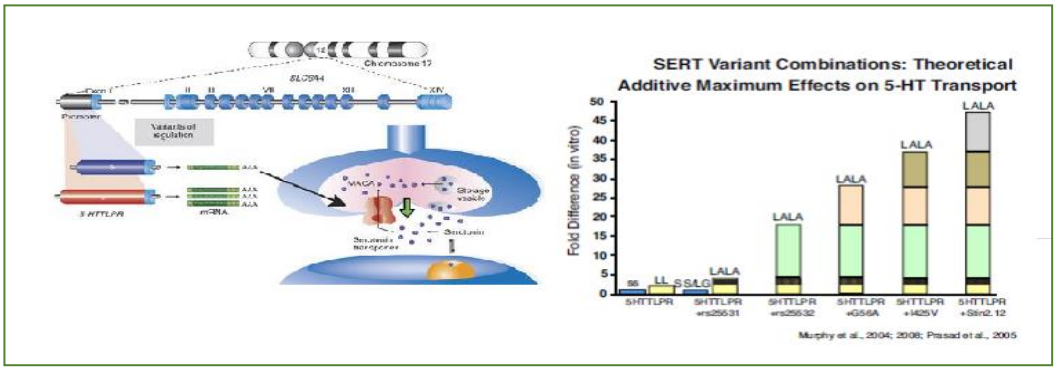

Fig. 7. Representación de la región del promotor 5-HTTLPR del gen *SLC6A4* (Murphy., 2011; Prasad 2005). Imagen izquierda se encuentra el gen *SLC6A4* y se amplifica la región promotora el 5-HTTLPR. Los alelos L (largo) y S (short), cambia la expresión del transportador a serotonina SERT en la neurona sináptica. En la imagen derecha, se muestra en la gráfica de expresión de los alelos del gen *SLC6A4*.

Variantes en los exones del gen SLC6A4

Las variantes genéticas reportadas en los exones del gen se clasifican de acuerdo a su función como: sinónimas (sSNP), en donde el cambio de nucleótido no

afecta al aminoácido. Las variantes no sinónimas (nsSNP), en las que el cambio de nucleótido, si afecta el aminoácido. A su vez, las variantes nsSNP, pueden ser de tipo conservadora y no conservadora. En la primera, el aminoácido es sustituido por otro con una cadena lateral químicamente similar, por lo que el efecto sobre la estructura y función de la proteína puede ser mínimo. La no conservadora, se caracteriza porque el aminoácido es sustituido por otro no similar, diferente en carga, polaridad, tamaño de la cadena. Son no conservadoras casi todas las sustituciones en la 2da posición del codón en el ribosoma (Luque J., 2001). Se estima que en las regiones de los exones ocurren el 85% de las alteraciones responsables de las enfermedades de base genética (Jackson et al., 2018).

Se han identificado variantes genéticas en los exones del *SLC6A4*, como la variante rara localizada en el exón 2, la cual se caracteriza por un cambio de una Guanina por una Adenina dando un cambio de aminoácido de Glicina por Alanina en la posición 56 (G56A) y el cambio de aminoácido le confiere ganancia de función a la proteína SERT, otra variante que también tiene el mismo efecto en la proteína es el cambio de Timina por Guanina, en el exón 8 el cual presenta un cambio de Lisina por Asparagina en la posición 605 (Prasad et al., 2009).

Se ha documentado que el cambio de Adenina por Guanina en el exón 3, cambia el aminoácido de Leucina por una Metionina en la posición 225, este cambio a nivel extracelular cambia el *loop*, lejos de los sitios de glicosilación y fosforilación descritos en el transportador. En el exón 9 se reportó que el cambio de una Adenina por una Timina en la posición 1273, el cual da cambio de aminoácido de una Isoleucina por una Valina en la posición 425, el cual está localizado en la región trans-membrana TM8 y se ha sugerido que la mutación modifica la estructura secundaria de la alfa hélice afectando el transporte. La caracterización funcional de esta variante demostró que el transportador otorga un aumento de función y esto ocurre por cambios en la regulación por los segundos mensajeros durante la internalización de la proteína, incrementando al doble, el transporte de 5-HT (Ozaki et al., 2003; Prasad et al., 2005). Se reportó que el cambio de Lisina en la posición 605 a Acido Aspártico, muestra un patrón de regulación alterado por múltiples serinas y treoninas, que se sabe que regulan el transportador en células nativas y transfectadas. En otro hallazgo, se reportaron variantes genéticas en los exones 2, 8 y 9 del *SLC6A4*, que confieren ganancia de función a la proteína transportadora (Sutcliffe et al., 2005). Otros hallazgos han reportado que la variante identificada en el exón 8, caracterizada por el cambio del aminoácido Pro339Leu, confiere una baja expresión de la

proteína a la superficie de la membrana. Finalmente existen variantes que confieren ganancia de función de la proteína como las Le255Met, Ser293Phe y la Leu362Met (Prassad et al., 2009).

4.5 Variabilidad genética en la población mexicana

Los principales procesos que generan la variación genética son las mutaciones, tanto en células somáticas como en las germinales; esto ocurre durante la recombinación de los cromosomas durante la meiosis. En todo caso, resulta necesario recordar que un cambio de nucleótido en una posición específica de la secuencia de un genoma, se denomina variante genética. Cuando existen dos o más versiones diferentes de una secuencia de ADN en la población, estas se denominan “alelos” cada alelo representa una versión particular (variante) de esa secuencia. Al analizar muchos genomas humanos, se puede calcular la frecuencia alélica con la que ocurre en la población, a menudo se expresa como la “frecuencia del alelo menor” o MAF. Podemos clasificarlas en términos generales como variantes raras, comunes o de baja frecuencia.

Las variantes comunes son aquellas que tiene una frecuencia del alelo menor MAF >0.05 en la población y son altamente polimórficos, se consideran que tienen un origen más antiguo, ya que ha subsistido a las fuerzas de selección natural y son más abundantes en las poblaciones (Conrad et al., 2010; Murdoch et al., 2013). Las variantes raras son aquellas que tienen una frecuencia del alelo menor < 0.01 en la población, se consideran que tienen un origen relativamente reciente, por lo que tienen la posibilidad de permanecer y aumentar su frecuencia en la población o bien desaparecer en las siguientes generaciones, también se han descrito variantes de baja frecuencia, las cuales presentan un MAF de 0.01-0.05 (Bomba et al., 2017).

Según sus características de estructura y organización de las variantes se distinguen diferentes tipos, como las denominadas inserciones o deleciones cortas (*indels*); las variaciones en el número de copias (CNVs) y las variantes de un cambio puntual de un nucleótido por otro, denominado SNP, los cuales constituyen el tipo de variante genética más común en el genoma humano. Se calcula que en promedio, cada 1,000 pares de bases de una secuencia genómica contiene de 2 a 10 SNPs. Esto significa que uno en cada 100-500 nucleótidos es polimórfico y la sustitución de Citosina por Timina (C/T) es más frecuente; De tal manera, se calcula que cada persona posee entre 3 y 4 millones de SNPs comunes en su genoma, en tanto que nuevos SNPs pudieran surgir de nuevas mutaciones (mutaciones *de novo*). A la fecha se han identificado más de 38

millones de SNPs en el genoma humano (Human Genome Variation Society, HGVS). Con la enorme cantidad de variación entre los genomas humanos individuales puede hacer que sea más fácil determinar que variantes son benignas y cuales podrían estar asociadas con una enfermedad. Incluso, la variante asociada estará presente dentro un contexto genómico de millones de otras diferencias de la secuencia de referencia (ancestral) y algunas de las cuales puede afectar la gravedad de la enfermedad en el individuo (Jackson et al., 2018).

De manera interesante, se han descrito que las variantes de tipo no sinónimas podrían ser consideradas como variantes causales, ya que pueden alterar la estructura y funcionalidad de la proteína y causar alteración biológica en el fenotipo (Pearl., 2000; Spirtes., 2000). De tal forma, que estas variantes por lo general son raras, ya que se encuentran sometidas a la selección natural para ser disminuida o eliminada en las poblaciones (Li et al., 1997; Nakken et al., 2007). Además, se ha planteado que las enfermedades complejas qué están influenciados por la selección natural con aparición temprana, como el autismo, estarían más cargadas de variantes raras, en comparación con otras enfermedades de aparición tardía como la esquizofrenia y el trastorno bipolar que estarían más enriquecidas de variantes comunes (Bomba et al., 2017; Kryukow et al., 2009).

Resulta relevante identificar las frecuencias alélicas en las diferentes poblaciones, con el propósito de evaluar en qué medida las poblaciones difirieren entre sí. Las poblaciones tienden a agruparse según su distancia geográfica, las geográficamente distantes tendrían menos probabilidad de intercambiar información genética a lo largo de su historia evolutiva humana. De tal forma que los cambios de frecuencia de los alelos son impulsados por la acción combinada de diferentes fuerzas evolutivas como la mutación, la selección natural, la deriva génica y la migración (Ewens., 1972; Jorde et al., 1998). En la población mexicana, el análisis de las frecuencias alélicas ha permitido establecer que existen diferencias entre grupos mestizos regionales, así como registrar que entre diversas poblaciones indígenas de nuestro país hay una marcada estratificación genética, producto quizá de sucesos de aislamiento geográfico (Moreno et al., 2014).

En nuestra población contemporánea, se considera a una persona mestiza si es nacido en México, tiene un apellido de origen español y ancestros de origen mexicano, tres generaciones hacia atrás (Gorodezky et al., 2001). La composición genética del mexicano es compleja debido a que por factores sociales, demográficos y económicos la distribución alélica no es ecuánime en nuestra población general y cambia de acuerdo a la

región geográfica analizada (Rangel et al., 1999). Existen zonas con poblaciones amerindias que han sufrido una reducción notable en el tamaño de la población casi al punto de extinción y poblaciones mayores donde el flujo genético se ha mantenido constante. El componente amerindio es la base de nuestra población junto con el europeo que trajeron consigo los españoles y una pequeña proporción proveniente de África introducida por los españoles (Beltran., 1944). Debido a que México representa uno de los reservorios de variación nativa americana, los estudios de secuenciación han utilizado matrices de comparación con marcadores identificados en poblaciones no nativas americanas, lo cual no permite el descubrimiento de nuevas variantes, por lo que es necesario realizar secuenciación en nuestra población. Esto nos aportara información sobre la identificación de las variantes y podremos conocer por medio de la anotación, la variación funcional en los genes que codifican a proteínas, así como los procesos adaptativos y demográficos que han dado forma a los genomas de los nativos mexicanos (Silva-Zolezzi et al., 2009; Moreno-Estrada et al., 2014).

Cabe señalar, que a pesar de los recientes proyectos de secuenciación a gran escala como el *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) y *Genome Aggregation Data Base* (gnomAD) que han ampliado considerablemente el conocimiento sobre los patrones de variación genética en el mundo (Lek et al., 2016; Collins et al., 2019), se sabe poco sobre la distribución de variantes genéticas específicas de las poblaciones, como la población mexicana (Silva-Zolezzi et al., 2009; Moreno et al., 2014), pudiendo ser la base de rasgos evolutivos y biomédicos. El estudiar la genética de los mexicanos nos ayudará a comprender y predecir el comportamiento de las enfermedades que tienen un componente genético, para que en un futuro próximo se pueda utilizar la medicina de precisión para prevenir las enfermedades psiquiátricas, como la AN y BN.

5. Estudios de epidemiología genética

5.1 Estudios en Familias

Los estudios en familias son metodologías que permiten determinar si las enfermedades multifactoriales tienen componentes genéticos en el desarrollo de la enfermedad. Los estudios en familia permiten identificar la agregación familiar de un fenotipo de interés. Lo que significa que en las familias de los pacientes donde hay más de un caso y la probabilidad de que uno de sus familiares de primer grado (padres y hermanos) desarrolle la misma enfermedad es mayor que la probabilidad que en los

miembros de las familias que no tienen antecedentes de la enfermedad (Flint et al., 2010). La agregación familiar en AN y BN se han documentado en diversos estudios, reportando que familiares de primer grado presentan hasta 10 veces más la probabilidad de desarrollar AN o BN que aquellos que no tienen algún pariente con trastorno alimentario (Kassett et al., 1989; Lilenfeld et al., 1998; Strober et al., 1990; 2000). De manera interesante, en otro estudio no reportaron casos de BN en familiares de individuos que tenían el subtipo de anorexia nervosa restrictiva, lo mismo se observó en familias con BN y obesidad (Fowler and Bulik., 1997; Grigoroui et al., 2003). Lo que se sugiere que familiares de AN y BN pudieran tener fenologías distintas en el componente genético y la dinámica familiar, ya que se ha documentado que familias con ANR presentan mayor rigidez cognitivo conductual, evitación al daño, ansiedad y rasgos obsesivos-compulsivos. En tanto que en familias con BN se identifican componentes de abuso de sustancias, bajo control de los impulsos y negligencia familiar.

5.2 Estudios en gemelos

Los estudios en gemelos son una herramienta útil para diferenciar los efectos de los genes y el medio ambiente en el origen y desarrollo de la AN y BN. Los gemelos monocigotos (MZ) comparten el 100% del ADN y, por lo tanto, las mismas variantes genéticas en todos los genes. En cambio, los gemelos dicigotos (DZ) comparten el 50% del ADN y las diferencias fenotípicas observadas entre los gemelos pueden atribuirse a factores ambientales (Plomin et al., 1994). Las estimaciones de heredabilidad (h2) basadas en gemelos se derivan de la similitud fenotípica entre gemelos MZ y DZ, el modelo estándar en gemelos captura la contribución relativa de factores genéticos aditivos (A), ambientales comunes (C) y ambientales únicos (E) en la variación de los rasgos o fenotipos (Hubel et al., 2018).

El primer estudio que se realizó fue en AN reportando que los gemelos MZ tenían tasas de concordancia más altas que los gemelos DZ (Holland et al., 1984; Treasure y Holland., 1990). Las estimaciones de heredabilidad en AN oscilan entre 48 y 74% (Bulik et al., 2006; 2010; Klump et al., 2001). En BN las estimaciones varían entre el 55 y 62% (Bulik et al., 1998; 2010; 2019).

Ciertos rasgos de personalidad en la AN y BN parecen tener componentes heredables, como lo han demostrado diversos estudios en gemelos monozigotos, en donde han reportado que la conducta de atracón, autoinducción del vómito y restricciones

alimentarias sugieren concordancia genética del 46 al 72%. Respecto a la ideación por la delgadez presentan una concordancia del 32 al 72% (Klump et al., 2000; Rutherford et al., 1993); en rasgos de personalidad obsesivos-compulsivos presentan concordancia genética del 30% en AN (Halmi et al., 2000; Vitousek y Manke, 1994). Otro rasgo heredable de la personalidad es la excesiva preocupación por equivocarse, que es un componente del perfeccionismo (Bacanu et al., 2005; Tozzi et al., 2005).

5.3 Estudios de ligamiento genético

Han sido una estrategia útil para la identificación de genes involucrados en el desarrollo, evolución y gravedad de las enfermedades multifactoriales. Los estudios de ligamiento es un método realizado en familias, que permite identificar los patrones de segregación de marcadores genéticos con una determinada enfermedad, además de conocer los mecanismos de transmisión del fenotipo en cuestión.

Los estudios de ligamiento realizados en AN y BN, reportan evidencia sugestiva de ligamiento en el cromosoma 1p33-36 en anorexia nervosa (AN). En este estudio se observó presencia de ligamiento aún más fuerte, en una sub-muestra de pacientes con el subtipo restrictivo (Grice et al., 2002). Posteriormente, realizando un análisis de ligamiento con pares de hermanos afectados e incorporando algunas variables conductuales, reportaron presencia de ligamiento en los cromosomas 1, 2 y 13 en pacientes con rasgos de obsesividad (Devlin et al., 2002). Otro hallazgo reporto que el gen *5-HT1D* localizado en el cromosoma 1p, se encontró asociado a la AN (Bergen et al., 2003).

Por otro lado, en un estudio realizado por Bulik et al (2005) reportan presencia de ligamiento en el cromosoma 10p en BN y al realizar el análisis en una muestra más homogénea definida por presentar conductas severas de auto-inducción de vómito, se observó una significancia estadística más fuerte. Este dato apoya los datos que muestran la alta heredabilidad para este tipo de conducta (Sullivan et al., 1998). También se ha reportado fenotipos como la obsesividad, ansiedad y el índice de masa corporal co-segregan con los TCA (Becanu et al. 2005; Tozzi et al., 2005), en los cromosomas 1q, 4p, 10p, 11q y 14q.

5.4 Estudios de asociación genética

Los estudios de asociación se basan de la hipótesis del estudio de variantes comunes en enfermedades comunes y comparan la frecuencia con que un marcador se presenta en un grupo de individuos afectados no relacionados, comparado con la que se

observa en un grupo de individuos sanos. Es decir, se establece la co-ocurrencia de un marcador con la enfermedad u otro rasgo fenotípico en individuos de una población que fueron seleccionados al azar. Con este tipo de metodología resulta útil para identificar el componente genético que subyace al desarrollo de las enfermedades. Existen dos tipos de estrategias, las cuales pueden ser estudios basados en familias y de casos y controles (Reich y Lander., 2001; Pritchard J., 2001).

Los estudios de asociación que se han realizado con variantes genéticas de la vía serotoninérgica, es el polimorfismo 5-HTTLPR del transportador de 5-HTT/SERT, en estudios en familias, reportando una mayor transmisión de la variante corta, el alelo S en AN (Hinney et al., 1997; Urwin et al., 2005). El primer estudio que observó asociación significativa entre la variante S y la BN fue en población caucásica, reportó que los pacientes portadores de dos copias del alelo corto presentan un riesgo 7 veces mayor de BN (DiBella et al., 2000). Otros hallazgos reportaron asociación entre la variante L y el subtipo BNP y TCA (Monteleone et al., 2006; Steiger et al., 2009). Nuestro grupo de investigación reportó asociación con el alelo S del 5-HTTLPR, observando que fue más frecuente en los pacientes con BN respecto al grupo control (Camarena et al., 2018).

En la tabla 6 y 7, se muestran los diversos estudios de asociación realizados entre el gen *SLC6A4* y la AN y BN, los estudios se enfocaron principalmente en la región del promotor, intrones y exón 2.

Tabla 6. Estudios de asociación basada en familias entre el 5-HTTLPR y TCA

Autor	Población	Muestra	Resultados
Hinney 1997	Caucásica	Familias tipo trio con AN=55	No transmisión (p=0.90). NS en IMC y edad inicio.
Urwin 2003	Caucásica	Familias tipo trio con AN=106	NS (p=0.92).
Urwin y Patrick 2005	Caucásica Asiática	Familias tipo trio con AN=114	Asociación con alelo S del 5-HTTLPR.

NS=no significativo p>0.05

Tabla 7. Estudios de asociación de casos y controles en TCA

Autor (año)	Población	Región del gen	Muestra	Resultado
Fumeron (2001)	Caucásica	Promotor	AN=67 Controles=148	Asociación del 5HTTLPR por genotipos (p=0.027) y alelos; p=0.024)
Lauzurica 2003	Caucásica	Promotor Intron 2	BNP=115 Controles=107	Asociación con el haplotipo *VNTR-SS
Matsushita (2004)	Asiática	Promotor	AN=77 BN=118 Controles=290	Asociación genotipos y alelos (p=0.02; p=0.005).
Sundaramurthy (2000)	Caucásica	Promotor	AN=138 Controles=90	Una mayor frecuencia de S-5HTTLR (p=0.0128).
Rybakowski (2006)	Caucásica	Promotor	AN=132 Controles=93	No reportó asociación con 5HTTLPR. La muestra fue de pacientes hospitalizados
Di Bella (2000)	Caucásica	Promotor	AN=112 BN=50 Controles=120	Asociación por genotipos y alelo S-5HTTLPR (p=0.0001; p=0.001) en BN.
Steiger (2009)	Caucásica	Promotor	AN=17 BN=108 TANE´s=60	Asociación por genotipos y alelo La/5HTTLPR (p=0.028) en AN (inhibidores/compulsivos).
Steiger (2011)	Caucásica	Promotor	AN=63 BN=221	Asociación variante S y variante rara G asociada con BN.
Munn-Chernoff (2012)	Caucásica	Intron 2, 3 y 8	AN y BN =165	No reportaron asociación
Camarena (2012)	Mexicana	Exon 2	AN=72 BN=189 Controles=226	Asociación variante rara 56A en AN
Camarena (2018)	Mexicana	Promotor	BN=189 AN=72 Controles=337	Asociación con alelo común S y el alelo raro G en BN (p=0.000).

*VNTR: Repetición en tándem del número de variables.

5.5 Estudios de Asociación del genoma amplio (*GWAS*)

Los estudios de GWAS, se basa de la hipótesis de analizar variantes comunes en enfermedades comunes (CD/CV). Este tipo de estudios requiere tamaños de muestra grandes para poder tener un adecuado poder estadístico. Se sabe que las variantes identificadas solo tienen un efecto pequeño en el fenotipo. (Breithaupt et al., 2018; Chakravarti 1999; Lander 1996; Kraft et al., 2009).

Los estudios de GWAS que se han realizado hasta la fecha han sido en AN (Tabla 8). El primer estudio se realizó en una muestra de 1033 pacientes y 3733 controles, donde se identificaron variantes genéticas asociadas como rs7532266 del gen *5-HT1D* relacionada con la vía serotoninérgica (Wang et al., 2011). Estos hallazgos alentaron a continuar los esfuerzos mediante GWAS, ya que se sugerían que existían señales significativas en los datos.

En el año 2013, se estableció el primer consorcio de genómica psiquiátrica en los trastornos alimentarios (PGC-ED), donde han surgido diversos hallazgos, logrando

estimar la heredabilidad en AN basado en los polimorfismos denominados SNPs, la cual se estimó en 0.20; además, se identificó un locus de riesgo en el cromosoma 12 (Duncan et al., 2017). De manera interesante, el PGC-ED reportó correlaciones genéticas entre AN y rasgos metabólicos y antropométricos, entre las cuales se observó correlaciones positivas con el colesterol de lipoproteínas de alta densidad y correlaciones genéticas negativas con el índice de masa corporal y obesidad. Con estos datos, el PGC-ED está obteniendo una comprensión más integral de como la variación genética contribuye al riesgo de AN; además, los estudios de GWAS han proporcionado información de vías biológicas asociadas a la AN, como el sistema serotoninérgico (Wang et al., 2011). El PGC-ED está recolectando activamente muestras genéticas de individuos con BN para realizar un GWAS e identificar variantes genéticas que pudieran estar asociadas, lo cual podría dilucidar genes y vías que se comparten entre AN y otros que pudieran ser específicos de BN (Bulik et al., 2019).

Tabla 8. Estudios de GWAS realizados en Anorexia nervosa

Autor, año	Población	Muestra	Resultados
Wang et al., 2011	AN=1,033 Controles=3,733	Caucásica	rs7532266 en *5-HTR1D,* rs6959888 en *ZNF804B*, rs533123 en OPRD1
Boraska et al., 2012; 2014	AN=2,907 AN-R=1,606 Controles=14860	Caucásica	AN-R: *ATP2B1* AN-CP: rs9839776 en *SOX2OT* rs17030795 en *PPP3CA*
Duncan et al., 2017	AN=3,495 Controles=10,982	Caucásica	Locus cromosoma 12 rs4622308 correlación con IMC
Huckins et al., 2018	AN mujeres=2,158 Controles=15,485	Caucásica	rs10791286 en *OPCML*, y el rs7700147 in *MIO1D* Cromosoma 17
Watson et al., 2019	AN=16,992 Controles 55,525	Caucásica	Varias comunes *NCKIPSD, CADM1, ASB3, MGMT, FOXP1, PTBP2, CDH10, NSUN3* asociada a rasgos psicopatológicos, antropométricos y metabólicos.

ZNF804B=Zinc finger protein 804B; *OPRD1*=Opioid receptor delta 1; *ATP2B1*=ATPase calcium transporting plasma membrane 1; S*OX2OT*=Overlapping transcript; *PPP3CA*=Protein phosphatase 3 catalytic subunit alpha; *OPCML*=Opioid binding protein/cell adhesion molecule like; *MIO1D*=Myosin 1D

5.6 Estudios de secuenciación completa del exoma (*Whole Exome Sequencing, WES*)

La secuenciación completa del exoma es una herramienta útil para identificar la base molecular de las enfermedades complejas. El exoma es la parte funcional del genoma formado por los exones, es decir, las partes que codifican a los genes y que darán lugar a las proteínas. Los estudios del exoma se basan de la hipótesis de estudiar variantes raras en enfermedades comunes (Dickson et al., 2010; Raychaudhuri S., 2011).

Hasta la fecha, se reportan tres estudios de secuenciación completa del exoma realizado en familias y dos estudios en casos (Tabla 9). El primer estudio incluyo a dos

familias con AN con múltiples miembros afectados con BN, la primera familia se caracterizó por presentar alto perfeccionismo, rasgos obsesivo-compulsivos, conductas restrictivas y comorbilidad con la ansiedad. Por el contrario, la segunda familia presentó menor ansiedad, conductas purgativas y con más miembros afectados con BN; lo que se sugiere que la AN y BN comparten características similares. En el estudio, se identificaron variantes genéticas en el gen del receptor de estrógeno *ESSRA*, el cual pudiera relacionarse con la modulación de la actividad serotoninérgica a partir de la síntesis y degradación del 5-HT, además, la proteína participa como un factor de transcripción que regula la expresión de genes relacionados con la producción de energía celular, también, se identificó otra variante rara en el gen *HDAC4*, esta proteína pertenece a la familia de histonas desacetilasas y participa en la regulación transcripcional y el ciclo celular (Cui et al., 2013; Smith et al., 2004).

En un estudio reciente, incluyo a dos familias con individuos masculinos con AN, los autores reportaron variantes en el gen de neuronatina (*NNAT*) en ambos probandos, una variante sin sentido (p.Trp33) y una variante rara en el 5-UTR, la proteína codificada por el gen *NNAT* es un proteo lípido que participa en la regulación de los canales iónicos durante el desarrollo del cerebro, también desempeña la función de formación y mantenimiento de la estructura del sistema del sistema nervioso (Lombardi et al., 2019). Otro hallazgo, identificó 39 variantes raras que compartían tres miembros afectados con AN, la variante p.Leu356Arg se localiza en el tercer bucle largo intracelular que codifica al gen *DRD4*, la variante p.Cys387Try fue ubicada en la región citoplasmática del gen *CCKA*, que codifica al receptor de colecistoquinina y la variante p.Met11Thr afecta el codón de inicio de la neuromedina del gen *NMS* (Bienvenu et al., 2019). En un estudio se reportó que pacientes con AN presentaban variantes raras (rs1126452, rs1042032 y rs1042064) en el gen *EPHX2*, el cual se expresa en tejidos neurales vasculares y no vasculares de relevancia para la AN y se sabe que influye en la función del colesterol (Scott-Van Zeeland et al., 2014).

Otro hallazgo, incluyo a dos grupos de estudio, el restrictivo que fueron pacientes diagnosticados con ANR y el grupo purgativo que incluyo a pacientes con ANCP, BNP y trastorno por atracón (TxA); donde se identificaron 186 genes en el grupo restrictivo. De manera particular, se observó un exceso de variantes raras reportadas como deletéreas en el gen de neurotesina (*NTS)*, el cual codifica para una proteína que funciona como neurotransmisor en el hipotálamo lateral y paraventricular y se involucra con la regulación del metabolismo de la grasa en el intestino. En el grupo purgativo se identificaron 245

genes en vías relacionadas con los neuropéptidos; de manera interesante, se identificó mayor número de variantes dañinas en el gen del glucagón *GLP-1,* el cual se ha sugerido como un vínculo entre la señalización de *GLP-1* y las conductas de atracón, como también en la disminución de la ingesta de alimentos inducida por la deleción del receptor alfa de estrógeno en las neuronas serotoninégicas en modelos animales. Además, se asoció a una disminución de la secreción del GLP-1 en las conductas de atracón en pacientes con BN (Cao et al., 2014; Naessen et al., 2011). Del mismo modo, se informó de variantes dañinas en el gen *BDNF*, el cual participa en la plasticidad neuronal del sistema nervioso, así como en la neurogénesis, el mantenimiento de la función neuronal y la integridad estructural de las neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas. De manera interesante, el gen *BDNF* ha sido asociado previamente con la ingesta de alimentos y el IMC en BN (Mason et al., 2013; Ribases et al., 2004; Lutter et al, 2017).

Tabla 9. Estudios de WES realizados en los trastornos alimentarios

Autor	Población	Muestra	Resultados
Cui et al., 2013	Caucásica	Familias con AN=2 con múltiples afectados	Identificación de variantes raras y comunes en AN rs200039730 *ESRRA* rs61754648 *HDAC4*.
Scott-Van Zeeland et al., 2014	Caucásica	Mujeres AN=261 Mujeres control=80	Genes *ESR2* y *EPHX2*
Lutter et al., 2017	Caucásica	ANR=35 ANCP, BNP y TxA=50	Grupo restrictivo=186 genes Grupo purgativo=245 genes Via neuropeptídica
Lombardi et al., 2019	Caucásica	Familias=2 Hombres con AN	p.Trp33, rs148287456 gen *NNAT*.
Bienvenu et al., 2019	Caucásica	Familia AN=1 Mamá afectada y 2 hijas. Papa no afectado	Le356Arg/*DRD4* afecta un bucle intracelular p.Cys387Try/*CCKAR* p. Met1Thr/*NMS* codón de iniciación de neuromodulina.

ESRRA= estrógeno related receptor alpha; *HDAC4*=Histone deacetylase; *ESRE*=Receptor estrógeno 2; *EPHX2*=Epoxide hidroxilase; *NNAT*=Neuronatina.

6. Asociación sintética

Los estudios de GWAS han identificado un gran número de variantes asociadas con la AN; sin embargo, este tipo de estrategia solo ha servido para analizar variantes comunes, ya que se basan en la hipótesis de estudiar en una enfermedad común variantes comunes y de baja frecuencia pero las variantes encontradas tienen baja penetrancia ya que solo explican una pequeña proporción de la heredabilidad (Schork et al., 2009). Más recientemente, se han realizado exploraciones genómicas mediante un mapeo fino o WES, que se basa en la hipótesis de estudiar una enfermedad común-

variante rara (CD/RV) logrando identificar alelos raros o de baja frecuencia asociados a AN y BN, teniendo un efecto causal en los trastornos alimentarios. Sin embargo, se ha propuesto que las variantes raras identificadas en los WES podrían estar cercanas a variantes previamente detectadas o nunca antes identificadas mediante los GWAS.

Dickson et al., (2010) planteó la hipótesis de asociación sintética, la cual se basa, que a partir de las asociaciones encontradas en los estudios de GWAS, no tienen un efecto causal asociado a las variantes comunes, sino más bien identifican otras variantes que pueden ser variantes raras o de baja frecuencia que se encuentren en desequilibrio de ligamiento con la variante común y estar asociada con la enfermedad con un efecto causal. Las variantes raras o de baja frecuencia pudieran estar alrededor de la región de interés y podría conferir un mayor riesgo de la enfermedad.

La asociación sintética se refiere a una asociación indirecta entre una variante común y al menos una o posiblemente muchas variantes raras. Usando el término sintético diferencia de lo indirecto, enfatizando que las características de la asociación son muy diferentes cuando la variante causante se presenta en menor frecuencia que el marcador identificado por un GWAS (Orozco et al., 2010).

De manera interesante, aunque no se ha encontrado asociación con el gen del transportador a 5-HTT/SERT en los estudios de GWAS en los TCA, existen estudios anteriores que han proporcionado evidencias de asociación genética en AN y BN (Camarena et al., 2018; Calati et al., 2011; Chen et al., 2015; Polsinelli et al., 2012).

Para la búsqueda de variantes raras en rasgos complejos, se han propuesto diversas metodologías, como la selección de fenotipos particulares, que pueden ayudar a identificar variantes que predispongan al riesgo de los trastornos alimentarios. Para esto, es necesario hacer una selección cuidadosa de los sujetos a estudiar en uno o ambos extremos del fenotipo alimentario y contar con el historial clínico que proporcione información de las características fenotípicas observables, tales como la impulsividad, conductas restrictivas, purgativas, compulsivas, ideación a la delgadez y el índice de masa corporal; los cuales pueden definir fenotipos de forma más homogénea (Bulik et al., 2019; Cirulli et al., 2010).

6.1 Selección de fenotipos en los trastornos alimentarios

El fenotipo es el conjunto o un subconjunto de las características observables o no observables de un individuo (Bansal et al., 2010; Hübel et al., 2018). Un enfoque alternativo en la investigación en genética es identificar y estudiar a individuos o familias

con fenotipos muy característicos y clínicamente relevantes. Esta estrategia ha demostrado una mayor eficacia para identificar las características moleculares subyacentes a tales fenotipos (Cirulli et al., 2010; Raychaudhuri et al., 2011). Una hipótesis que motiva la selección de un fenotipo es enriquecer la presencia de variantes raras que puedan tener un efecto causal sobre el fenotipo. Además, las variantes pueden ser identificadas en genes donde ya previamente se ha reportado asociación con variantes comunes y raras, como el gen *SLC6A4* que ha sido asociado a AN y BN (Calati et al., 2011; Chen et al., 2015).

Hallazgos anteriores, han utilizado métodos para definir fenotipos homogéneos en los trastornos de la conducta alimentaria, como obtener información sobre los antecedentes heredofamiliares o rasgos que tienen componente heredable, como el rasgo obsesivo-compulsivo, el perfeccionismo, la pulsión por la delgadez, la ansiedad, ideación por la delgadez y las conductas restrictivas en AN. Así mismo, los estados emocionales negativos, la auto-inducción del vómito y la impulsividad son rasgos que muestran un componente heredable en BN (Anderluch et al., 2003; Bulik et al., 2007; Micali et al., 2011; Lacey and Evans., 1986; Wonderlich et al., 2005). Estos pueden ser identificados mediante el uso de cuestionarios que evalúan dimensiones de la personalidad que relevantes para la etiología de la AN y BN (Bulik et al., 2006; Hübel et al., 2018).

Investigaciones previas, han reportado evidencias sobre rasgos psicopatológicos que definen fenotipos clínicamente relevantes. Hallazgos previos, han estudiado los TCA desde la visión dimensional. Por ejemplo, los estudios de análisis por clúster han identificado sub-fenotipos, como los compulsivos (sobre-regulados) e impulsivos (desregulados). Los sujetos del grupo compulsivo estaban constituidos por pacientes con ANR, los cuales presentan conductas como la rigidez cognitiva y conductual.

Con respecto al grupo impulsivo, se caracterizó por estar formado de pacientes con características del espectro bulímico, como la ANCP y BN, presentando rasgos como la pérdida de control sobre las conductas de atracón. Además, estos sub-fenotipos han sido asociados con variaciones en genes del sistema serotoninérgico como el gen S*LC6A4* (Friederich and Herzog., 2011; Steiger, et al., 2009; van den Eynde et al., 2011). Además, otras investigaciones han empleado medidas de evaluación que tienen que ver con el control de los impulsos y las emociones negativas en la BN, donde han caracterizado a sujetos impulsivos, los cuales se caracterizan por presentar episodios de atracón, autolesiones y comorbilidad clínica como el abuso de sustancias y trastorno

límite de la personalidad (van de Eynde et al., 2011; Wildes and Marcus., 2013b; Wonderlich., 2007).

7.1 Justificación

La AN y la BN son un problema de salud pública en México dado que se tienen reportes del incremento de este padecimiento en los últimos años en nuestro país (Romero-Martínez et al., 2018). De acuerdo con la encuesta nacional de salud pública en los trastornos psiquiátricos, la prevalencia para adolescentes se estimó en 0.6 para AN y 1.8 para bulimia, siendo más frecuente en mujeres (Benjet et al., 2012; 2016). Es un trastorno multifactorial, donde se involucran factores ambientales y biológicos. Se ha documentado que la AN y la BN tienen componentes heredables, de acuerdo a hallazgos en estudios en gemelos y en familias.

Por otra parte, la 5-HT ha mostrado ser un neurotransmisor relacionado en la regulación de la conducta alimentaria y los estados emocionales. Diversos estudios neurobiológicos muestran que cambios en el sistema serotoninérgico se encuentran asociados a la AN y BN. Estudios de imagen reportan que la disponibilidad de 5-HT a nivel de sinapsis se encuentra regulado por el transportador de 5-HTT/SERT, el cual se encarga de transportar y regular la homeostasis serotoninergica

Estudios clínicos, han planteado la hipótesis serotoninérgica en la AN y BN, reportando alteraciones en la densidad del 5-HTT en áreas del hipotálamo relacionados con los estados de ánimo y la señal de saciedad; además, se han reportado alteraciones en las concentraciones del metabolito de 5-HT en pacientes con AN y BN. En estudios genéticos se han identificado variantes genéticas en exones del gen que confieren ganancia o pérdida de la función de la proteína SERT.

Los estudios de asociación genética realizados en familias, y en casos-controles, han reportado asociación entre variantes raras y comunes en el *SLC6A4* en AN y BN en nuestra población. En particular, se han asociado variantes localizadas en la región promotora y los intrones 2, 3 y 8 (Camarena et al., 2018; Lauzurica et al., 2003; Munn-Chernoff et al., 2002). De manera interesante, las variantes genéticas situadas en la región promotora y el intrón 2 han sido asociadas con cambios en la expresión y funcionalidad de la proteína SERT (Hu et al., 2006; Mackenzie et al., 1999; Ali et al., 2010), por lo que resultaría interesante identificar variantes genéticas de riesgo en el exón 1, el cual se encuentra cercano a la región del promotor.

Diversos hallazgos han reportado variantes genéticas en el gen *SLC6A4,* asociadas a rasgos psicopatológicos en la AN y BN, lo que resultaría interesante poder identificar otras variantes vinculadas con los rasgos psicopatológicos en los trastornos alimentarios. En los exones 8 y 9 se han identificado variantes raras asociadas al

trastorno obsesivo-compulsivo, el cual comparte características clínicas con la anorexia nervosa; sugiriendo un fenómeno de pleiotropía.

El *SLC6A4* es un gen candidato en la anorexia nervosa y bulimia nervosa, sin embargo, la mayoría de los estudios se han enfocado en estudiar la región del promotor e intrones, por lo que resultaría interesante identificar otras variantes que se localicen en los exones 1,2,3,8 y 9 del *SLC6A4* en la población mestiza mexicana.

Para los estudios de secuenciación, la selección de fenotipos extremos en la distribución de los trastornos alimentarios permitirá enriquecer la presencia de variantes que puedan tener un efecto causal en el fenotipo de AN y BN (Barnet et al., 2013; Keel et al., 2004; Li et al., 2011).

Por otra parte, las frecuencias de las variantes genéticas varían entre poblaciones, por lo que resulta importante su estudio en pacientes mexicanos.

El presente trabajo es el primero en realizar un análisis de secuencia del gen *SLC6A4* en pacientes con AN y BN en población mexicana, con el propósito de identificar variantes raras y comunes que pudieran estar relacionadas con la etiología de los TCA.

7.2 Hipótesis

Los pacientes con anorexia nervosa y bulimia nervosa presentan un mayor número de variantes raras y comunes en el gen *SLC6A4* en comparación con el grupo control.

7.3 Pregunta de investigación

¿Se identificará en anorexia nervosa y bulimia nervosa un mayor número de cambios en la secuencia de cinco exones candidatos (1, 2, 3, 8 y 9) del gen *SLC6A4* en comparación con el grupo control?

7.4 Objetivo General

Identificar variantes raras y comunes en cinco exones candidatos del gen *SLC6A4* en pacientes mexicanos que presenten AN y BN comparado con un grupo de controles sanos.

7.4.1 Objetivos Particulares

1.- Identificar en una muestra de pacientes con TCA, aquellos que presentan una mayor gravedad de la sintomatología clínica definiéndolos como fenotipos extremos.

2.- Analizar la secuencia de nucleótidos de los exones 1, 2, 3, 8 y 9 del gen *SLC6A4* en los fenotipos extremos y en un grupo control.

3.- Identificar variantes genéticas en los dos fenotipos extremos y en un grupo control.

4.- Predecir si las variantes encontradas tienen un impacto en la función de la proteína.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Muestra de estudio:

El estudio se realizó en el departamento de Farmacogenética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM). Se cuenta con una base clínica y un banco de DNAg de 428 mujeres diagnosticadas con trastornos de la conducta alimentaria.

Selección de los fenotipos extremos en los TCA

Se realizó la selección de los fenotipos extremos con base al análisis de las características clínicas que son relevantes en los TCA y tienen un fuerte componente heredable, los cuales incluyeron: el índice de masa corporal (IMC), antecedentes de historia familiar de TCA, conductas restrictivas o purgativas, gravedad de los síntomas obsesivo-compulsivos mediante la escala de Yale-Brown Conrnell-ED, el nivel de impulsividad y los síntomas psicológicos relacionados con los TCA mediante la aplicación del inventario de trastornos alimentarios EDI-2.

Criterios de inclusión:

Que aceptaran participar en el estudio mediante firma del consentimiento informado.
Ser mexicanos con tres generaciones de padres y abuelos mexicanos.
Que cumplieran con los criterios diagnósticos del DSM-IV-TR para AN o BN.
Que no presentarán síntomas psicóticos y enfermedad médica no controlada.
Que fueran del sexo femenino

Grupo Control

En el departamento de Farmacogenética se cuenta con muestras de ADN genómico de 400 sujetos sanos.

Criterios de inclusión:

Sin antecedentes psiquiátricos, medido mediante la aplicación de la escala SCID.
Individuos no relacionados con otro participante en el estudio.
Edad de 30 a 65 años
Sexo femenino
A partir de estas características se seleccionaron 50 participantes. Previa firma dela carta de consentimiento informado de todos los participantes.

El proyecto fue aprobado por el comité de ética en investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Escalas clínicas utilizadas para la evaluación

Los pacientes cumplieron los criterios diagnósticos del DSM-IV-TR (APA, 1994) para AN o BN, valorados mediante la aplicación de la entrevista clínica estructurada para diagnósticos del eje I, v2.0 (SCID-1). Se utilizó la base electrónica de los pacientes con la información demográfica y clínica, información obtenida mediante la aplicación de las siguientes escalas:

1) *La escala de Yale-Brown de Cornell para TCA* (Caballero et al., 2003): Es una escala que evalúa rasgos de preocupaciones y rituales con respecto a los alimentos. El punto de corte para considerar una mayor gravedad es ≥16 puntos.

a) Las preocupaciones son definidas como ideas, pensamientos, imágenes o impulsos que entran en la mente de forma repetida, que pueden ocurrir en contra de la voluntad. Incluyen aspectos relacionados con la comida, el peso y la apariencia física.

b) Los rituales son definidos como conductas o actos que se realizan de manera impulsiva. Incluyen cualquier conducta o acto relacionado con los alimentos, el consumo de estos, la apariencia, el peso y el ejercicio.

La escala evalúa cuantitativamente la gravedad de los síntomas de preocupaciones y de rituales.

2) Escala de Impulsividad de Plutchik (Páez et al., 1996). Es una escala que evalúa el grado de impulsividad. La escala mide diferentes aspectos, como la capacidad para planificar, el control de los estados emocionales y el control de las conductas de consumo de alimentos, a mayor calificación se considera niveles más altos de impulsividad. La escala consta de 4 sub-escalas que miden 4 factores:

a) El autocontrol: está compuesto por seis reactivos que mide los aspectos relacionados con la capacidad que tiene el sujeto para esperar o retrasar sus acciones. Este factor pudiera estar relacionado con la tendencia de tomar decisiones rápidas en su vida diaria.

b) La planeación de las acciones en el futuro: incluye la posibilidad de darse cuenta de las consecuencias de sus actos y aun así perseverar en las ideas.

c) Conductas fisiológicas: Evalúa el poco control sobre el consumo de los alimentos y la actividad sexual.

d) Actuación espontánea: se refiere a las conductas irreflexivas; es decir, no razonan las posibles consecuencias del proceder precipitado.

3) Inventario de Trastornos de la conducta alimentaria EDI-2 (Garcia 2003):

Es un instrumento que evalúa síntomas que acompañan a la AN y BN. Consta de 91 preguntas agrupadas en seis categorías o sub-escalas, cada una se califica, y son clínicamente relevantes en los trastornos de la conducta alimentaria. Se reportó como punto de corte ≥80 puntos para identificar gravedad en los rasgos psicológicos en los trastornos de la conducta alimentaria. Las sub-escalas que evalúan las actitudes y conductas psicológicas relacionadas con la forma de la figura y el peso son las siguientes:

a) Ideación por la delgadez: es la búsqueda incesante por la delgadez, presentan preocupación excesiva por el peso, las dietas y el miedo a engordar.

b) Bulimia: evalúa la tendencia a tener pensamientos constantes a realizar conductas de atracón de comida de manera incontrolable para luego realizar conductas compensatorias.

c) Insatisfacción corporal: mide la inconformidad del individuo con la forma general de su cuerpo. Este es uno de los principales factores responsables del inicio y persistencia de conductas encaminadas a controlar el peso.

d) Perfeccionismo: mide el grado en que el sujeto cree que solo es aceptable un nivel de rendimiento personal excelente y está convencido de que los demás esperan de él resultados excepcionales.

e) Conciencia interoceptiva: evalúa el grado de confusión o dificultad para reconocer y responder adecuadamente a los estados emocionales.

f) Miedo a la madurez: evalúa el temor del paciente a las experiencias psicológicas o biológicas relacionadas con el peso en la edad adulta y el deseo de volver a la apariencia prepuberal. Temor a enfrentar las responsabilidades de la edad adulta.

8.2 Análisis genético

Secuenciación de los exones 1, 2, 3, 8 y 9 del gen SLC6A4

La amplificación de los cinco exones del gen *SLC6A4* se realizó utilizando las sondas previamente reportados por Kraft et al., (2005) (Tabla 10).

Tabla 10. Primers utilizados para la amplificación de los cinco exones del *SLC6A4*

Región*	Secuencia de los oligonucleótidos	Tamaño Amplicón (pb)	Tm (°C)**
Exón 1A	5´GAGCGCAACCCATCCAGCGGGAGC 3´CGCTGGGGCGCATGCACCTCCTCG	390	60
Exón 2	5´ATGGACTGCCATGTAGCAAA 3´AGCTCAGCCACTAGGGTGGT	498	60
Exón 3	5´GGATGTGATCCTGCCTGTTC 3´TGCCTAAGGCCTGACTGATT	519	60
Exón 8	5´CATGGCAGTCAGAGCTTCAG 3´CATGCCCAGCCTTCTTTG	461	60
Exón 9	5´TGTCAACCACCTCCTCCTCT 3´ GCCAAGGGACAGTGCTTAAT	416	65

TM** Temperatura de alineamiento de la secuencia. Exón 1A: Se seleccionó porque actúa como splicing alternativo que regula la expresión tejido-específica del trasportador en el sistema nervioso central.

Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se llevó a cabo la amplificación de cada uno de los exones, en un volumen final de reacción de 25 µl conteniendo 100 ng de DNA genómico, DMSO al 5%, 1X KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Kappa Biosystems), y 0.5 µl de cada primer. Las condiciones de PCR fueron a 96°C por 3 minutos, seguidos por 25 ciclos a 96°c por 15 segundos a 60°C por 15 segundos (a excepción el exón 9 que fue a 65°C) y finalmente a 72°C por 30 segundos Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa y agarosa Metaphor 1.5%, para la confirmación de la banda se usó un marcador de peso molecular de 50 a 1000 pares de bases DNA ladder. Fueron visualizados con luz UV después de la tinción con bromuro de etídio con una concentración de 0.5 µg/ml para identificar las bandas específicas.

Purificación de los amplicones de cada exón:

Se utilizaron dos kits de purificación QAquick (Quiagen) y la enzima Exonucleasa 1 alcalina fosfatasa (ExoSAP-IT). El kit de QAquick utiliza columnas que contienen membranas de sílice para la unión del DNA. La purificación se realizó con un volumen del producto de PCR de 15 µl, se adicionó buffer PB (clorhidrato de guanidina) durante 30 minutos y se centrifugo durante 2 minutos a 18°G. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó a la columna una cantidad de 750 µl del buffer PE (etanol), volviendo a

centrifugar por tres minutos. La muestra se diluyó 30 µl de H_20 de PCR. La dilución se guardó en refrigeración a 4°C.

El kit de ExoSap (Applied Biosystems) requirió de 2 µl del producto de PCR y 3 µl del kit ExoSap, obteniendo un volumen final de 5 µl, se colocaron en un tubo eppendorf y se calentó 63°C en un termobloque (eppendorf) por 15 minutos, seguido de una inactivación de la enzima a 80°C por 15 minutos, posteriormente se colocaron en hielo y finalmente se cuantificó el producto purificado.

Pureza de las muestras mediante espectrofotometría.

Mediante espectrofotometría se midió la concentración y la pureza del producto purificado basándose en la capacidad de absorbancia a una longitud de onda determinada. La concentración de la muestra se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm, mientras que la relación de absorbancias 260/280 se usó para evaluar la pureza de las muestras definidas por un valor entre el rango 1.8-2.0 nm. En cuanto a la absorbancia de 230 nm mide los valores de muestras contaminadas con sales, fenoles o carbohidratos, se considerará la relación de A230/260 en el rango entre 1.5-2.0 nm en valores óptimos para que las muestras puedan ser consideradas para realizar la secuenciación.

Para la secuenciación de terminación de cadena por Sanger, se enviaron las muestras al centro GENEWIZ (https://www.genewiz.com/) en Nueva Jersy E.U. Las muestras enviadas, contenían 4 ng/µl del producto de PCR purificado y 10 µM del oligonucleótido forward. Los productos fueron analizados por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI 3730xl.

El método de secuenciación de Sanger por terminación de cadena consistió en preparar la mezcla de reacción conteniendo: 4 ng/µl del producto purificado de PCR, 2 µl de BygDye Termination V3.1, 2 µl de buffer de secuencia 2.5X y 1 µl de primer foward 10 µM. La mezcla fue homogenizada y se dio un pulso en la microcentrifuga. Se colocó 4 µl de la mezcla de reacción en cada pozo de la placa de 96 pozos. Las condiciones de PCR fueron a 96°C por 10 segundos, seguidos por 25 ciclos 50°C por 5 segundos a 60°C por 4 minutos y finalmente a 4°C por 30 segundos. Posteriormente se realizó la purificación del producto de secuenciación utilizando el kit BigDye XTerminator^{tm} Purification Kit.

El producto de PCR purificado se carga en una placa de PCR de 96 pozos, se coloca en la máquina de secuenciación. Se verifica que las jeringas tengan el polímero

(POP6), se revisa que todos los conductos y la bomba de zafiro se encuentren sin burbujas, que los compartimientos del amortiguador tengan los niveles apropiados de buffer de EDTA 1X y agua de PCR esterilizada. Al terminar la electroforesis se obtienen dos archivos abi y seq, los cuales se analizan en los siguientes programas bioinformáticos.

8.3 Análisis de datos de la secuenciación

Para el análisis de secuencias de cada uno de los exones se realizó lo siguiente:

a) Alineamiento de las secuencias de cada exón, usando el programa Bioedit (Hall; 1999) y Mega X64 (Kumar., 2004). Son programas que permiten la edición de alineamientos y análisis de múltiples secuencias de ADN.

b) Se obtuvo una secuencia consenso, usando el programa CLC Sequence Viewer 8v (http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/current/index.php?manual=Viewing_mode.html&_ga=2.222653011.956518962.1605642737-1759400887.1605642737). El programa puede realizar una serie de funciones como editar alineaciones, determinar y gestionar una secuencia consenso de cada exón para obtener así una secuencia de referencia.

c) Alineamiento contra genoma de referencia del *SLC6A4* del GenBank, número de acceso NM_001045.5.

d) Se realizó la comparación de las secuencias de los casos y los controles en la página BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI). La herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) encuentra regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula la significación estadística de las coincidencias. BLAST se puede utilizar para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como para ayudar a identificar miembros de familias de genes.

8.4 *Espectro de variantes genéticas en el SLC6A4*

a) Variante por sustitución: consiste en el reemplazo de un nucleótido por otro en una posición de la secuencia.

b) Deleción: consiste en la pérdida de uno o más nucleótidos de una secuencia.

c) Inserción: es la introducción de uno o varios nucleótidos adicionales en una secuencia.

d) Variantes que cambian el marco de lectura: consiste en la inserción o deleción de nucleótidos que origina un desfasamiento en la secuencia normal de tripletes en los que debe ser traducido el RNAm; en consecuencia, la proteína incorpora aminoácidos erróneos y frecuentemente un codón de terminación prematuro.

e) Variantes que no cambian el marco de lectura: la inserción o deleción de 3 pares de bases en el DNA, aunque añade o elimina algún aminoácido a la proteína, no cambia el marco de lectura, por lo tanto, el resto de la secuencia de aminoácidos es normal.

f) Variantes con terminación prematura de la proteína: algunas variantes no afectan a la secuencia de aminoácidos codificados, sino que la sustitución, la inserción o la deleción de varios nucleótidos tiene como efecto la aparición de un codón de terminación o de paro (UAA, UAG, UGA) (Luque., 2001).

Para la búsqueda de las posibles variables, las secuencias fueron alineadas con la secuencia consenso de *SLC6A4* obtenida previamente como control comparativo así como cada una de los SNP reportados en las bases de datos citadas (*nosynoymous SNP functional predictions Exome Variant Server* (http://evs.gs.washington.edu/EVS), *Human Genome Variation database* (http://www.1000genomes.org/), *genomAD* (https://gnomad.broadinstitute.org/) y *dbSNP* NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/).

Identificación de las variantes raras y comunes

De acuerdo con la identificación de las variantes genéticas, Bomba et al., (2017) define las variantes comunes como aquellas que tienen una frecuencia del alelo menor MAF>0.05, las variantes raras tienen un MAF <0.01 y las variantes de baja frecuencia tienen un MAF =0.01-0.05.

8.3 Análisis *in silico* de la predicción de la proteína:

Se utilizaron dos programas computacionales para el análisis de predicción. Se utilizó el programa computacional *Polyphen*-2 (Polimorfismo Phenotyping v2) (*http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/*.) la cual es una herramienta que predice el impacto de un aminoácido sustituido en la estructura y función de la proteína humana. La predicción se basa en reglas empíricas que son aplicadas a la secuencia filogenética y la información estructural que caracteriza la sustitución. PolyPhen-2 predice el efecto de una

sustitución de aminoácidos en la estructura y función de una proteína utilizando homología de secuencia, estructuras 3D de la proteína cuando estén disponibles y una serie de otras bases de datos y herramientas Para cada sustitución de aminoácidos proporciona una predicción cualitativa (“probablemente dañino", "benigno" o "desconocido") y una puntuación que va de 0 a 1. El puntaje de PolyPhen representa la probabilidad de que una sustitución sea perjudicial, por lo que los valores más cercanos a uno se predicen como perjudiciales.

PolyPhen predice que un snSNP es:

a) Probablemente dañina: apoya con alta confidencia que la proteína está afectada en función o estructura.

b) Benigna: carece de cualquier efecto fenotípico.

También, se utilizó el programa SIFT (http://sift.bii.a-star.edu.sg/), herramienta basada en la homología de la secuencia que predice si es probable que una sustitución de aminoácidos afecte la función de la proteína basándose en la homología de secuencia y la similitud físico-química entre los aminoácidos alternativos. Los datos que proporcionamos para cada sustitución de aminoácidos son una puntuación y una predicción cualitativa ("tolerada" o "perjudicial") con una puntuación que va de 1 a 0, por lo que es más probable que las puntuaciones más cercanas a cero sean perjudiciales.

8.4 Análisis estadístico

Para el análisis de variables continúas se utilizaron pruebas de análisis multivariable, ANOVA, prueba de t. Para los datos categóricos se utilizaron pruebas de chi-cuadrada, obtención de frecuencias. Se realizó el análisis discriminante para seleccionar las variables dependientes o predictivas para diferenciar a los grupos, considerando los valores de λ de Wilkis y la correlación canónica (valor ≥0.5), y se realizó el análisis de clúster.

9. RESULTADOS

9.1 Identificación de los fenotipos extremos en los pacientes con TCA

A partir de una muestra inicial de 428 pacientes mujeres con TCA se realizó el análisis de las características demográficas y clínicas. En la muestra, el 8% se diagnosticaron con ANR (n=36), el 9% con ANCP (n=37), el 40% BNP (n=176), el 4% a BNNP (n=19) y el 39% fueron TANE´s (n=160) (Figura 8).

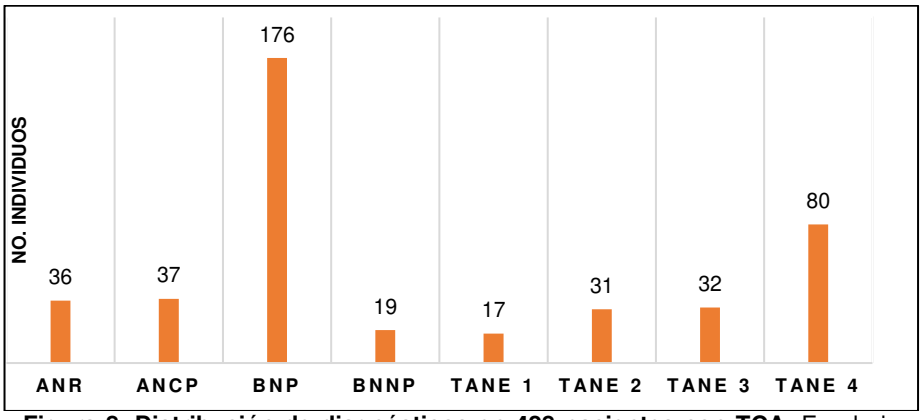

Figura 8. Distribución de diagnósticos en 428 pacientes con TCA. En el eje de la X se encuentra la distribución de los subtipos diagnósticos de anorexia nervosa restrictiva **(ANR)**; anorexia nervosa compulsiva purgativa **(ANCP)**; bulimia nervosa purgativa **(BNP)**; bulimia nervosa no purgativa **(BNNP)**; Trastornos alimentarios no específicos **(TANE´s: 1-4)**. En el eje de la Y son los números de individuos.

El estudio incluyó solo a mujeres, ya que la incidencia del trastorno alimentario es en mujeres, la relación mujer hombre es de 9:1. Se realizó el análisis por ANOVA de un factor, de las características clínicas en las 428 mujeres con TCA. Como se puede observar en la tabla 11, las características que muestran diferencias significativas entre los grupos diagnósticos son el IMC, el número de purgas, la impulsividad y las características medidas con la escala EDI-2. De tal manera que dichas características fueron consideradas para la selección de los grupos diagnósticos extremos.

Del mismo modo, se observó que los TANE1, TANE2, TANE3 y TANE4 presentan una gran variabilidad, reflejo de la heterogeneidad de los pacientes, pero con calificaciones intermedias entre la ANR y la BNP. Por lo anterior, se decidió llevar a cabo un nuevo análisis tomando en cuenta solo los pacientes de los cuatro grupos diagnósticos; es decir ANR, ANCP, BNP y BNNP.

Tabla 11. Características demográficas y clínicas de 428 pacientes mujeres con TCA

Características clínicas	ANR (n=36) x̄±D.E	ANCP (n=37) x̄±D.E	BNP (n=176) x̄±D.E	BNNP (n=19) x̄±D.E	TANE 1 (n=17) x̄±D.E	TANE 2 (n=31) x̄±D.E	TANE 3 (n=31) x̄±D.E	TANE 4 (n=76) x̄±D.E	F	P
IMC (kg/m^2)	16±1.0	17±4.0	23±4.0	27±8.0	17±2.0	20±2.0	24±5.0	22±3.0	40.3	0.000*
Edad (años)	18±4.0	19±2.0	20±5.0	21±4.0	21±5.0	17±3.0	23±8.0	19±6.0	4.58	0.000*
Edad inicio (años)	15±3.0	14±3.0	14±3.0	13±5.0	16±3.0	14±2.0	14±3.0	14±3.0	1.520	0.172
Núm. Purgas (semana)	0	12±11	12±10	0	3.0±6.0	4.0±5.2	4.0±5.0	10±11	9.42	0.000*
Impulsividad_Plutchik	14±8.0	21±8.0	26±7.0	25±8.0	21±6.0	19±8.0	21±7.0	21±7.0	9.33	0.000
Autocontrol	5.0±4.0	9.0±4.0	11±4.0	11±3.0	8.0±3.0	8.0±4.0	9.0±4.0	9.0±4.0	9.07	0.000*
Planeación	6.0±2.0	6.0±2.0	7.0±3.0	7.0±3.0	8.0±3.0	7.0±2.0	5.0±2.0	6.0±3.0	2.24	0.030
Conductas_fisiologicas	1.0±1.0	2.0±1.0	3.0±1.0	2.0±1.0	1.0±1.2	1.0±1.0	2.0±2.0	1.0±1.0	13.70	0.000*
Actuación espontánea	3.0±2.0	4.0±2.0	6.0±2.0	5.0±2.0	4.0±2.0	4.0±3.0	5.0±2.0	5.0±2.0	4.26	0.000
Yale Brown Cornell_ED	15±9.0	17±7.0	19±5.0	16±5.0	15±7.0	15±6.0	17±4.0	16±7.0	1.89	0.072*
Preocupación	9.0±4.0	9.0±3.0	10±2.0	10±2.0	10±2.0	8.0±3.0	8.0±2.0	8.0±4.0	2.64	0.012*
Ritual	7.0±5.0	9.0±4.0	9.0±4.0	7.0±3.0	8.0±5.0	7.0±4.0	8.0±2.0	7.0±4.0	1.22	0.292
EDI-2	53±24	73±29	89±24	72±32	70±32	68±26	80±39	80±40	6.02	0.000
Ideación_delegadez	8.0±6.0	12±6.0	15±4.0	15±3.0	9.0±6.0	10±6.0	14±6.0	14±7.0	7.44	0.000*
Bulimia	1.0±1.0	6.0±4.0	9.0±4.0	5.0±2.0	2.0±3.0	3.0±4.0	7.0±6.0	6.0±5.0	18.17	0.000*
Insatisfacción corporal	10±4.0	12±6.0	17±5.0	16±5.0	10±5.0	12±6.0	15±5.0	14±6.0	6.73	0.000*
Perfeccionismo	6.0±3.0	9.0±9.0	9.0±4.0	6.0±5.0	8.0±7.0	6.0±4.0	8.0±5.0	8.0±5.0	2.49	0.016
Conciencia_interoceptiva	6.0±6.0	12±7.0	14±6.0	14±8.0	10±6.0	11±7.0	14±9.0	12±8.0	5.17	0.000*
Miedo a madurar	8.0±5.0	7.0±4.0	8.0±5.0	7.0±7.0	11±6.0	8.0±6.0	9.0±7.8	10±7.0	0.45	0.865

*Corrección por Bonferroni.

En el análisis de los cuatro subtipos diagnósticos de ANR, ANCP, BNP y BNNP (Tabla 12), se observa que las características que muestran diferencias son el IMC, la impulsividad, el Yale-Brown de Cornell y la escala EDI-2. Dado que estas calificaciones mostraron diferencias que distinguen de manera clara al grupo de las 36 mujeres con ANR, se decidió seleccionarlo como un fenotipo extremo como uno de los grupos para realizar el estudio denominándolo como el *fenotipo restrictivo*.

Del mismo modo, se decidió realizar un análisis adicional entre los tres grupos restantes, con el propósito de identificar de manera más clara, el fenotipo extremo al grupo de ANR.

Tabla 12. Análisis por ANOVA de las características demográficas y clínicas de mujeres con AN y BN

Características clínicas	ANR (n=36) $\bar{x}$±D.E	ANCP (n=37) $\bar{x}$±D.E	BNP (n=176) $\bar{x}$±D.E	BNNP (n=19) $\bar{x}$±D.E	F	P
IMC (kg/m²)	16±1.0	17±4.0	23±4.0	27±8.0	19.9	0.000*
Edad (años)	18±4.0	19±2.0	20±5.0	21±4.0	3.30	0.021*
Núm de purgas/semana	0	12±11	12±10	0	0.22	0.198
Impulsividad_Plutchik	14±8.0	21±8.0	26±7.0	25±8.0	15.5	0.000*
Autocontrol	5.0±4.0	9.0±4.0	11±4.0	11±3.0	14.3	0.000*
Planeación	6.0±2.0	6.0±2.0	7.0±3.0	7.0±3.0	3.71	0.013
Conductas fisiológicas	1.0±1.0	2.0±1.0	3.0±1.0	2.0±1.0	12.6	0.000*
Actuación espontánea	3.0±2.0	4.0±2.0	6.0±2.0	5.0±2.0	7.40	0.000
Yale_Brown Cornell_ED	15±9.0	17±7.0	19±5.0	16±5.0	2.85	0.040
Preocupación	9.0±4.0	9.0±3.0	10±2.0	10±2.0	3.23	0.024
Ritual	7.0±5.0	9.0±4.0	9.0±4.0	7.0±3.0	2.24	0.086
EDI-2	53±24	73±29	89±24	72±32	12.8	0.000
Ideación_delegadez	8.0±6.0	12±6.0	15±4.0	15±3.0	11.3	0.000*
Bulimia	1.0±1.0	6.0±4.0	9.0±4.0	5.0±2.0	30.9	0.000*
Insatisfacción corporal	10±4.0	12±6.0	17±5.0	16±5.0	11.2	0.000*
Perfeccionismo	6.0±3.0	9.0±9.0	9.0±4.0	6.0±5.0	2.24	0.088
Conciencia_interoceptiva	6.0±6.0	12±7.0	14±6.0	14±8.0	7.38	0.000*
Miedo a madurar	8.0±5.0	7.0±4.0	8.0±5.0	7.0±7.0	0.16	0.923

9.1.2 Análisis discriminante entre los grupos de ANCP, BNP y BNNP

Con el propósito de seleccionar al fenotipo extremo como grupo de comparación en el estudio, primero se realizó un análisis de clúster, que resulta apropiado para identificar que variables clínicas medidas en ANCP, BNP y BNNP, permitan diferenciar a los subtipos diagnósticos. Para el análisis se incluyó las siguientes variables clínicas: edad, IMC, número de purgas, impulsividad (autocontrol, planeación, conductas fisiológicas, actuación espontánea), escala de Yale-Brown de Cornell-ED (preocupaciones y rituales) y el Inventario de trastornos alimentarios (ideación por la delgadez, bulimia, insatisfacción corporal, perfeccionismo, conciencia interoceptiva y miedo a madurar).

En el análisis discriminante, se observó que el auto valor fue de 0.900 y la correlación canónica fue de 0.900, la cual es confiable, ya que nos indica que las variables clínicas incluidas son lineales y suficientes para determinar la variabilidad entre los subtipos diagnósticos para discriminarlos mejor, las cuales tiene que reportan valores cercanos a 1 (Tabla 13).

Tabla 13. Prueba de inclusión de pasos y la correlación canónica

Prueba de pasos	Auto valor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	0.900	65	65.0	0.900

El estadístico lambda de Wilks (λ), permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de los grupos son iguales, los valores cercanos a 1 indicarán similitudes de las variantes clínicas entre los grupos, si su valor es cercano a 0 debe interpretarse que los grupos son diferentes y, por lo tanto, la función discriminante puede pronosticar que las variables clínicas incluidas son suficientes para diferenciar a los grupos de estudio. Su significación se realiza mediante la transformación al valor de Chi-square.

En el análisis realizado, se observó un valor de λ Wilkis, de 0.543, lo que significa que existe un sobre-lapamiento entre los subtipos diagnósticos; sin embargo, el valor transformado de lambda (x^2=65.72 P=0.000) reporta diferencias significativas, en consecuencia, se rechaza la hipótesis nula de que los subtipos diagnósticos son iguales. Cabe señalar que se realizaron varias pruebas discriminantes incluyendo o excluyendo variables clínicas que resultaran informativas para obtener valores de λ de Wilkis que fueran óptimos para agrupar a los individuos de acuerdo con sus similitudes clínicas. Las variables que finalmente se incluyeron fueron: el IMC, la impulsividad, el autocontrol, conductas fisiológicas, la preocupación hacia los alimentos, la ideación por la delgadez, la bulimia y la insatisfacción corporal (Tabla 14).

En la prueba de igualdad de medias de Lambda de Wilkis, se encontró en BNP, mayor nivel de impulsividad; en particular en el autocontrol y las conductas fisiológicas; en la escala de Yale-Brown de Cornell, la preocupación por los alimentos; y finalmente en el inventario de trastornos alimentarios muestra diferencias, particularmente dado por la ideación por la delgadez, bulimia y la insatisfacción corporal en comparación con los grupos de ANCP y BNNP (Tabla 14).

Tabla 14. Prueba de igualdad de medias de Lambda de Wilkis entre ANCP, BNP y BNNP

Características clínicas	ANCP $\bar{x}$±D.E	BNP $\bar{x}$±D.E	BNNP $\bar{x}$±D.E	Lamda Wilkis	F	P
IMC (Kg/m²)	17±4.0	23±4.0	28±8.0	0.930	3.62	0.030
Edad (años)	19±2.0	20±5.0	22±7.0	0.752	1.61	0.331
Núm. purgas (sem)	12±11	12±10	0	0.801	1.00	0.195
Impulsividad_Plutchik	21±8.0	26±7.0	24±6.0	0.937	3.61	0.030
Autocontrol	9.0±4.0	11±4.0	10±4.0	0.962	2.14	0.022
Planeación	6.0±2.0	7.0±3.0	6.0±2.0	0.957	2.45	0.091
Conductas_fisiologicas	2.0±1.0	3.0±1.0	2.0±1.0	0.933	3.89	0.023
Actuación espontánea	4.0±2.0	6.0±2.0	4.0±1.0	0.966	1.95	0.151
Yale_Brown Cornell_ED	17±7.0	19±5.0	17±4.0	0.975	1.35	0.262
Preocupación	9.0±3.0	10±2.0	9.0±3.0	0.942	3.18	0.040
Ritual	9.0±4.0	9.0±4.0	7.03.0	0.983	0.92	0.402
EDI-2	73±29	89±24	83±36	0.939	3.51	0.033
Ideación delgadez	12±6.0	15±4.0	14±4.0	0.938	3.59	0.031
Bulimia	6.0±4.0	9.0±4.0	8.0±6.0	0.912	5.23	0.007
Insatisfacción corporal	12±6.0	17±5.0	15±5.0	0.921	4.63	0.012
Perfeccionismo	9.0±9.0	9.0±4.0	8.0±5.0	0.852	0.88	0.147
Conciencia interoceptiva	12±7.0	14±6.0	14±8.0	0.988	0.67	0.511
Miedo a madurar	7.0±4.0	8.0±5.0	8.0±7.0	0.998	0.10	0.897

En el último paso del análisis discriminante, se muestra el cuadro del resumen de los subtipos diagnósticos que cambiaron, debido a que presentaron semejanzas en los valores de las medias de las variables clínicas (Tabla 15).

Tabla 15. Matriz de reclasificación de los diagnósticos clínicos

De \ A	ANCP	BNNP	BNP	n (%)
ANCP	19	0	18	37 (16)
BNNP	1	17	1	19 (8)
BNP	4	1	171	176 (76)
Total	24	18	190	232 (100)

Dado que se observó que 171 individuos con BNP presentaron valores similares en las características clínicas, se procedió a realizar un análisis de clúster de k-medias con el fin de identificar grupos homogéneos de menor tamaño y que tuvieran características similares entre ellos, pero diferentes a los de los otros grupos para así identificar al otro fenotipo extremo de comparación.

9.1.3 *Análisis de clúster de k-medias en el grupo de BNP*

Se llevó a cabo el análisis de clúster en el grupo de las 171 pacientes con BNP identificando cinco clases diferentes, se observó que la clase 1 presentó mayor IMC, la impulsividad y el inventario de trastornos alimentarios (Tabla 16).

Tabla 16. Características clínicas de las clases en 171 mujeres con BNP

Características clínicas	Clase 1 $\bar{x}$±D.E n=50	Clase 2 $\bar{x}$±D.E n=34	Clase 3 $\bar{x}$±D.E n=27	Clase 4 $\bar{x}$±D.E n=40	Clase 5 $\bar{x}$±D.E n=20	F	P
IMC (Kg/m^2)	25±4.0	24±5.0	24±4.0	24±5.0	24±4.0	3.07	0.018
Impulsividad_Plutchik	27±7.0	25±5.0	24±7.0	25±6.0	24±7.0	2.05	0.050
Autocontrol	12±4.0	10±3.0	10±4.0	10±4.0	9±2.0	1.10	0.335
Conductas_fisiologicas	3.0±2.0	2.0±1.0	2.0±1.0	2.0±1.0	2.0±1.0	0.18	0.515
Preocupaciones_YBC-ED	9.0±2.0	8.0±3.0	8.0±3.0	8.0±3.0	9±3.0	9.50	0.040
EDI-2	90±46	68±36	66±31	70±38	82±32	13.95	0.000
Ideación delgadez	18±8.0	16±7.0	15±5.0	14±6.0	14±8.0	9.39	0.000
Bulimia	12±8.0	9.0±8.0	8.0±5.0	10±7.0	9.0±9.0	6.59	0.000
Insatisfacción corporal	17±5.0	15±5.0	15±3.0	15±6.0	13±5.0	1.19	0.314

Se reportó que el grupo 1 mostro menor varianza (104.13) y la lambda de Wilkis fue de 0.07 lo que indicó que se trata del grupo más homogéneo. (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis estadístico de la interacción en BNP

Clases (no.Ind)	Varianza intraclase	Lambda de Wilkis
1.0 (n=50)	104.13	0.07
2.0 (n=34)	670.85	0.05
3.0 (n=27)	525.95	0.04
4.0 (n=40)	489.17	0.03
5.0 (n=20)	474.04	0.03

De manera interesante, el grupo 1 presentó menor valor de varianza intraclase de las variantes clínicas, lo que significa que presentó mejor homogeneidad en este grupo, además, se observó diferencias en las calificaciones del IMC e inventario de trastornos alimentarios en las 50 mujeres con BN, se decidió seleccionarlo como un fenotipo relevante en los trastornos alimentarios definiéndolo como uno de los grupos para realizar el estudio denominándolo como el *fenotipo purgativo*.

9.1.4. Descripción de los fenotipos extremos identificados

El fenotipo restrictivo constituido por 36 mujeres con el diagnostico de anorexia nervosa restrictiva, el cual presentó mayor control de los impulsos hacia el consumo de los alimentos (14±8.0), realizando conductas restrictivas, se observó un índice de masa corporal bajo (16±1.0). En lo que respecta a los rasgos psicopatológicos de las conductas alimentarias, se reporta que el fenotipo presenta una preocupación excesiva por el

incremento de peso (8±6.0), realizando dietas estrictas (1.0 ±1.0) y presenta inconformidad con la forma general de su cuerpo (10±4.0).

El fenotipo purgativo, estuvo representado por 50 mujeres diagnosticadas con bulimia nervosa purgativa, el cual presentó bajo control de los impulsos hacia el consumo de los alimentos (27±7), con pensamientos persistentes sobre la preocupación excesiva por ganar peso (18±8.0). Además, realizan conductas purgativas (12±10) con el fin de no ganar peso, sin embargo, el IMC es de 25 kg/m^2. Con respecto a la característica de bulimia, se reporta que el fenotipo presenta pensamientos persistentes sobre el consumo de alimentos (12±8.0), lo que lo lleva a realizar conductas de atracón y purgas (12±10), de manera que no pueden controlar su consumo de alimentos (12±4.0) y presentan una mayor insatisfacción por su figura corporal (17±5.0) (Tabla 18).

Tabla 18. Prueba de t-Students de las características clínicas del fenotipo restrictivo y purgativo

Características clínicas	Fenotipo restrictivo (n=36) $\bar{x}$±D.E	Fenotipo purgativo (n=50) $\bar{x}$±D.E	t	P
IMC (kg/m^2)	16±1.0	25±4.0	-13.30	0.0000
Edad (años)	18±4.0	20±4.0	-2.11	0.0500
Núm. Purgas (sem)	0	12±10	-5.03	0.0001
Impulsividad Plutchik	14±8.0	27±7.0	-6.13	0.0001
Autocontrol	5.0±4.0	12±4.0	-6.39	0.0001
Conductas fisiológicas	1.0±1.0	3.0±1.0	-5.16	0.0001
Preocupaciónes_YBC-ED	9.0±4.0	9.0±2.0	-2.01	0.0900
EDI-2	53±24	90±46	-3.72	0.0000
Ideación por delgadez	8.0±6.0	18±8.0	-4.43	0.0001
Bulimia	1.0±1.0	12±8.0	-6.63	0.0001
Insatisfacción corporal	10±4.0	17±5.0	-5.10	0.0001

9.2 Análisis genético

Se realizó la amplificación de los exones 1, 2, 3, 8 y 9 del *SLC6A4* en 36 pacientes con el fenotipo restrictivo, 50 pacientes del fenotipo purgativo y 50 sujetos control (Figura 9).

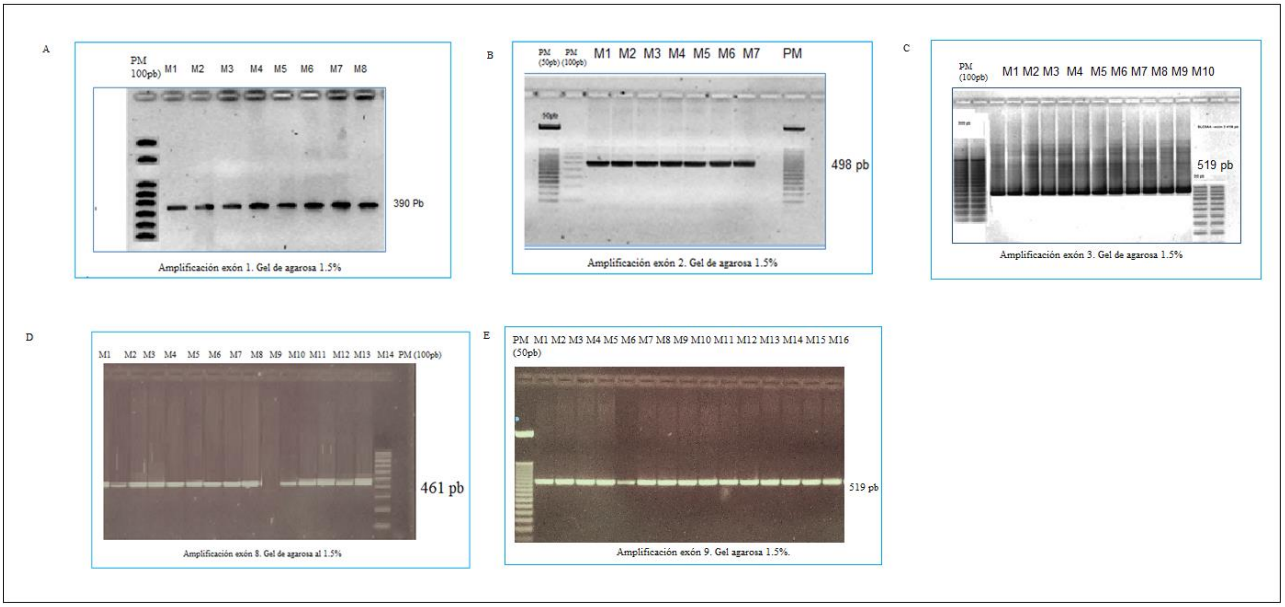

Figura 9. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etídio. Amplificación de los productos de PCR en la figura (a) se muestra la amplificación del exón 1 con 390pb. En la figura (b) se muestra el exón 2 con 498 pb. En la figura (c) se encuentra el exón 3 con 519 pb. En la figura (d) se encuentra el exón 8 con 461 pb. En la figura (e) se encuentra el exón 9 con 519 pb. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, escalera de 100 pb.

9.2.1 Identificación de variantes genéticas en el fenotipo restrictivo

En el análisis de las secuencias del fenotipo restrictivo y los controles, se observó un mayor número de variantes genéticas en el fenotipo restrictivo (n=11), en relación con las identificadas en los controles (n=5). Así mismo, se observó un mayor número de variantes en el exón 2; sin embargo, en el exón 9 no se identificaron variantes en el fenotipo restrictivo y controles, de acuerdo con el análisis comparativo con las bases públicas gnomAD, dbSNP y 1000 Genomes con la secuencia de los exones del gen *SLC6A4* (Tabla 19).

Tabla 19. Número de variantes genéticas identificadas en los cinco exones del gen *SLC6A4* en el fenotipo restrictivo y el grupo control.

Exón	Secuencia (pb)	Fenotipo restrictivo		Sujetos control	
		Núm. variantes nuevas	Núm. variantes dbSNP	Núm. Variantes nuevas	Núm. Variantes db SNP
1	390	2	0	1	0
2	498	0	4	0	3
3	519	0	2	0	1
8	461	1	2	0	0
9	416	0	0	0	0
Total	**2,284**	**3**	**8**	**1**	**4**

Con respecto al tipo de variantes genéticas en los cinco exones, se observó que el fenotipo restrictivo presentó mayor número de deleciones (n=2) y de variantes dbSNP (n=6) que se encuentran reportadas en las bases publicas gnomAD y dbSNP, en relación con los controles (Figura 10).

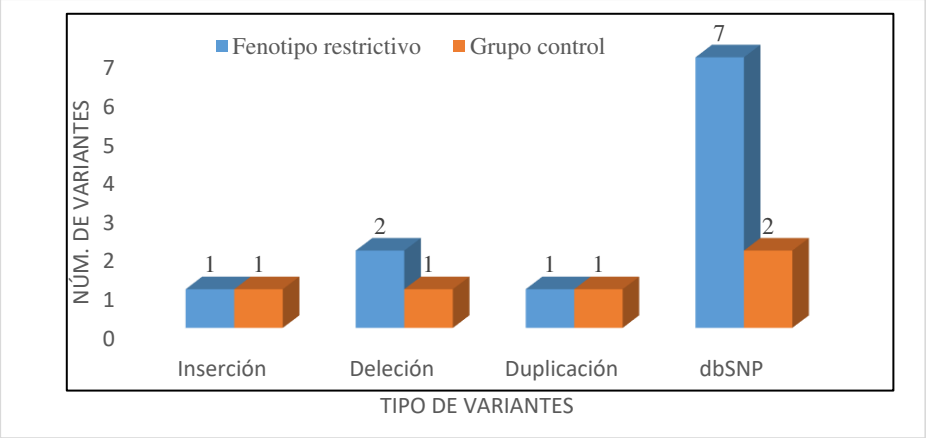

Figura 10. Tipo de variantes genéticas en los cinco exones del *SLC6A4* en el fenotipo restrictivo. En el eje de la x se encuentra el tipo de variantes genéticas. En el eje de la Y se encuentra el número de variantes genéticas.

En relación con la clasificación de variantes sinónimas y no sinónimas, se observó que el fenotipo restrictivo presentó un mayor número de variantes no sinónimas (n=5) en comparación con el grupo control (n=4); además, se observó 3 variantes sinónimas y 3 nuevas (Figura 11).

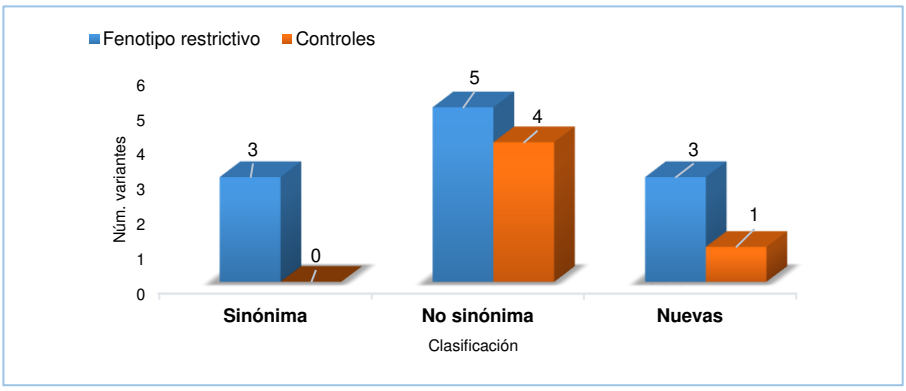

Figura 11. Variantes sinónimas, no sinónimas y nuevas localizadas en los exones del *SLC6A4* en el fenotipo restrictivo. En el eje de la X se encuentran la clasificación de variantes genéticas. En el eje de la Y se encuentra el número de variantes genéticas.

El análisis de la secuencia de los 5 exones en el grupo restrictivo y el control, se identificaron dos variantes nuevas, la g.130delA localizada en el exón 1, identificadas en

dos sujetos homocigotos a la deleción de Adenina y en el grupo control se observó la inserción (Figura 12a). La c.1740G>A localizada en el exón 8, se observó en un sujeto heterocigoto1740A, no siendo observada en los controles. (Figura 12b). De manera interesante, las variantes nuevas identificadas no han sido reportadas en las bases públicas del exóma y del Proyecto 1000 genomas.

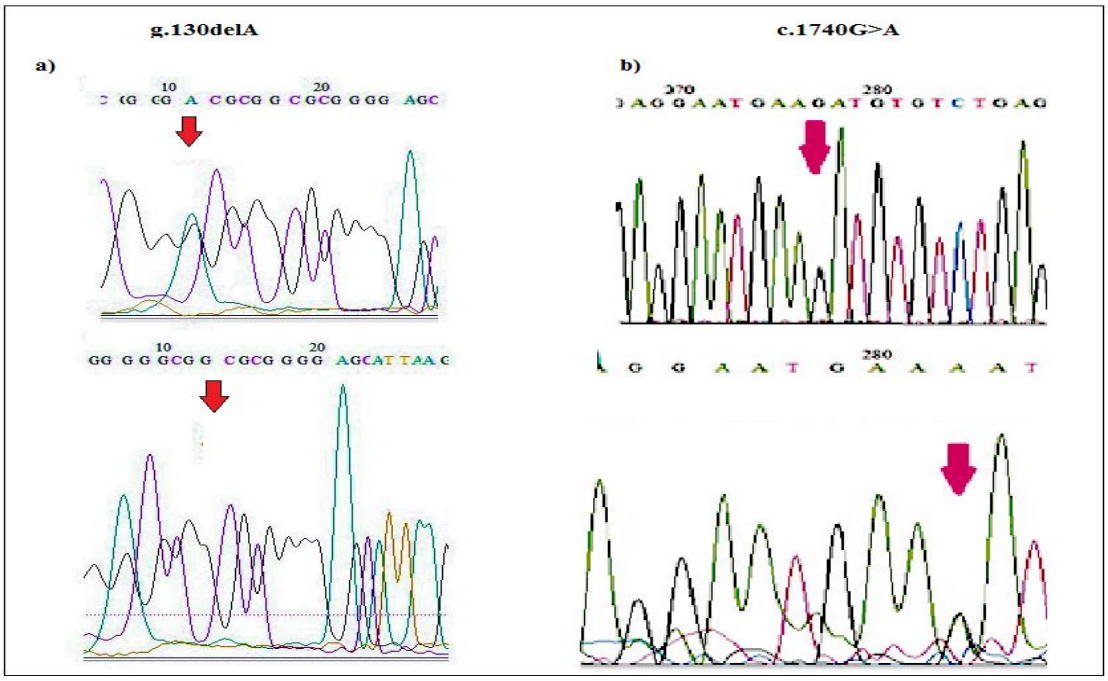

Figura 12. Electroferogramas de las variantes nuevas identificadas en el fenotipo restrictivo y el grupo control. En el panel (a) se muestra la variante 130delA. En la parte superior se presenta el alelo con la inserción de A y en la parte inferior la deleción de A. En el panel (b) se muestra la variante c.1740G>A. La parte superior muestra el alelo G y en la parte inferior el alelo A. La flecha roja indica el sitio del cambio de nucleótido.

Se identificaron variantes sinónimas que previamente ya han sido reportadas en las bases del exoma humano y el GenBank, como la variante c.411G>A, localizada en el exón 3, un sujeto fue homocigoto a la Adenina (Figura 13a). Se reportaron dos variantes genéticas en el exón 8, como la c.1149C>T, la cual fue observada en un sujeto que fue heterocigoto a Timina (Figura 13b) y la variante c.1164G>A, se identificó en un sujeto que fue heterocigoto a Adenina (Figura 13c). Es interesante señalar, que las variantes identificadas no se reportaron en el grupo control. Además, se ha documentado que las variantes sinónimas no afectan el cambio de aminoácido ni la secuencia de la proteína transportadora de 5-HTT/SERT.

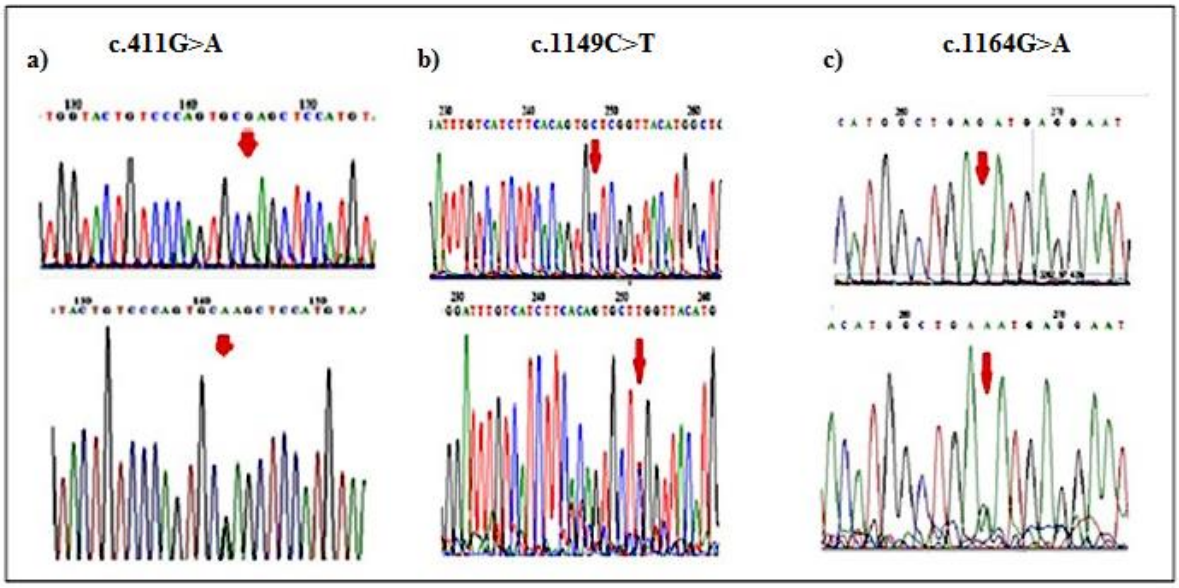

Figura 13. Electroferogramas de variantes sinónimas identificadas en el fenotipo restrictivo y el grupo control. En el panel (a) se muestra la variante c.411G>A. En la parte superior se presenta el alelo con la variante G y en la parte inferior la variante A. En el panel (b) se reporta la variante c.1149C>T. En la parte superior se presenta el alelo C y en la parte inferior la variante T. En el panel (c) se observa la variante c.1164G>A. En la parte superior se presenta el alelo con la variante G y en la parte inferior la variante A. La flecha roja indica el sitio del cambio de nucleótido.

Con respecto a la variante no sinónima, se reportó que la c.268T>A, localizada en el exón 2 se encontró en tres sujetos heterocigotos para la variante Adenina (Figura 14), la cual causa un cambio de aminoácido de leucina a fenilalanina (L90F), no afectando la longitud de la proteína; sin embargo; en el análisis de la predicción de la proteína se reportó como deletérea y dañina (SIFT= 0.01; Polyphen=1).

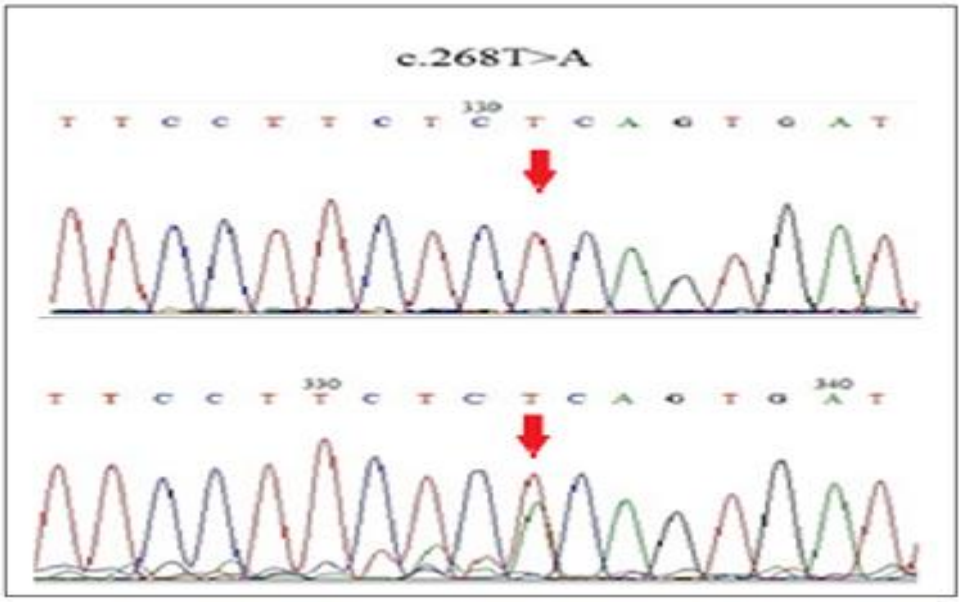

Figura 14. Electroferograma de la variante no sinónima identificada en el fenotipo restrictivo y el grupo control. Se muestra la variante c.268T>A. En la parte superior se presenta se reporta el alelo T y en la parte inferior se observa el alelo A. La flecha roja indica el sitio del cambio de nucleótido.

Se observaron cinco SNPs que estuvieron presentes en los 50 sujetos control como en las 36 mujeres del fenotipo restrictivo. Se observó un SNP nuevo g.136delC en el exón 1 (Figura 15a) de manera interesante también, se encontró ausente en las bases públicas de genomAD y del Proyecto 1000 genomas. Además, se reportaron SNPs no sinónimas, como la c.139_140InsAC en el exón 2, la inserción nucleotídica predice un cambio de aminoácido (p.T47fs) que afecta el desplazamiento de marco de lectura en la traducción (Figura 15b). Otra variante que tuvo el mismo efecto, fue la c.1179dupA, localizada en el exón 3, y el cambio de aminoácido (p.V394C) afecta la longitud de la secuencia de la proteína transportadora SERT (Figura 15c). También, se observaron dos SNPs localizadas en el exón 2, como la c.148G>C y el cambio de aminoácido (V50L) no afecta la longitud de la proteína, sin embargo, en el análisis de la predicción de la proteína se reportó como tolerante y benigna (SIFT: 0.32; Polyphen=0.059) (Figura 15d). Otro fue la c.121C>T, que el cambio de aminoácido (G41A) da como resultado una secuencia de aminoácidos diferente, pero conserva la longitud de la proteína, sin embargo, de acuerdo a los análisis de la predicción de la proteína se reportó como deletérea (SIFT=0.04) y benigna (Polyphen=0.23) (Figura 15e).

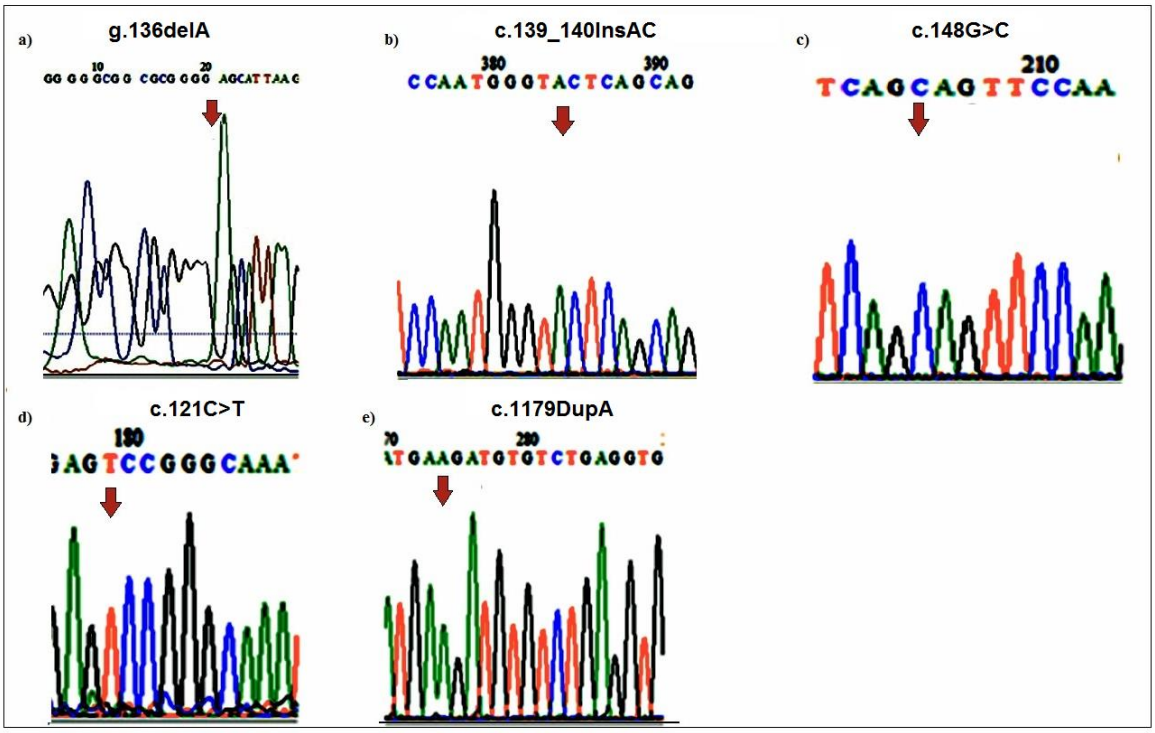

Figura 15. Electroferogramas de los SNPs compartidos en el fenotipo restrictivo y el grupo control. . En el panel (a) se muestra la g.136delC; (b) la c.139_140InsAC; (c) la c.148G>C; (d) la c.121C>T; (e) la c.1179DupA. La flecha roja indica el sitio del cambio de nucleótido.

9.2.2. Variantes raras y comunes en el fenotipo restrictivo

En la tabla 21 se muestran las frecuencias del alelo menor de la población estudiada. Como se puede observar en el fenotipo restrictivo no se logró identificar ningún alelo raro; sin embargo, se logró observar 6 variantes de baja frecuencia, definido por tener un MAF=0.01-0.05. Además, se identificaron 5 variantes genéticas comunes en el fenotipo restrictivo y el grupo control (Tabla 20).

En la figura 16, se representa la localización de las variantes identificadas en los cinco exones del gen *SLC6A4* en el fenotipo restrictivo.

Tabla 20. Frecuencia del alelo menor en el fenotipo restrictivo

Región gen	Referencia dbSNP	Cambio Nucleótido	Cambio de aminoácido	Predicción		Grupos	
						Frecuencia alelo menor (MAF)	
				SIFT	PolyPhen	Fenotipo restrictivo (n=36)	Control (n=50)
Exon 1	Nueva	g.130delA	-	-	-	0.03	0
Exon 1	Nueva	g.136delC	-	-	-	1	1
Exon 2	rs769651028	c.139_140insAC	p.T47fs	-	-	1	1
Exon 2	rs202152288	c.148G>C	p.V50L	Tolerante	Benigna	1	1
Exon 2	rs1183088111	c.268T>A	p.L90F	Deleteria	Dañina	0.04	0
Exon 2	rs140436169	c.121C>T	p.G41A	Deleteria	Benigna	1	1
Exon 3	rs34542731	c.1179dupA	p.V394fs	-	-	1	1
Exon 3	rs57172732	c.411G>A	p.L137	-	-	0.01	0
Exon 8	rs55908624	c.1149C>T	p.L383	-	-	0.01	0
Exon 8	rs74478645	c.1164G>A	p.G388	-	-	0.01	0
Exon 8	Nueva	c.1740G>A	-	-	-	0.01	0

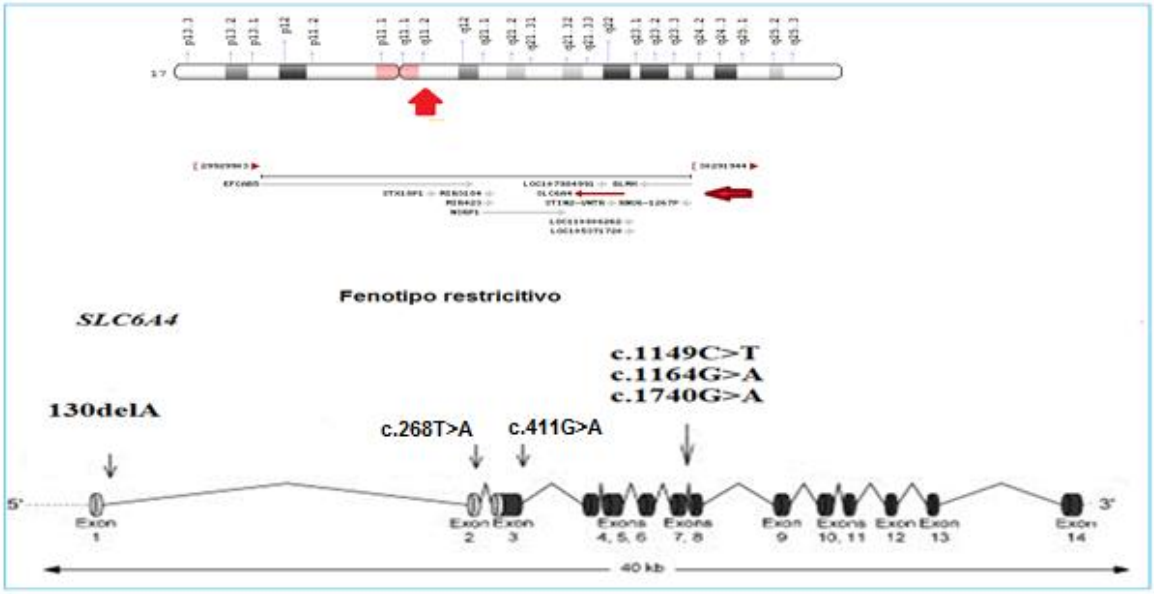

Figura 16. Localización de las variantes genéticas en los cinco exones del gen *SLC6A4* en el fenotipo restrictivo. En la parte superior, se encuentra el cromosoma 17, donde se señala con la flecha roja la ubicación del gen 17q11.1. En la parte inferior, se representa el gen *SLC6A4* con 14 exones y se reportan las variantes genéticas identificadas en los exones del gen.

9.3. Identificación de variantes genéticas en el fenotipo purgativo

El análisis de las secuencias del fenotipo purgativo y los controles observó un mayor número de variantes genéticas en el fenotipo purgativo (n=8) en comparación con los controles (n=5). Así mismo, se observó mayor número de variantes en el exón 2, tanto en el fenotipo purgativo como los controles. Además, se observó un menor número de variantes (n=1) en los exones 8 y 9 en el fenotipo purgativo. (Tabla 21).

Tabla 21. Numero de variantes genéticas identificadas en los cinco exones del *SLC6A4* del fenotipo purgativo

		Fenotipo purgativo		Sujetos control	
Exón	**Secuencia (pb)**	**Núm. variantes nuevas**	**Núm. variantes dbSNP**	**Núm. Variantes nuevas**	**Núm. Variantes db SNP**
1	390	2	0	1	0
2	498	0	3	0	3
3	519	0	1	0	1
8	461	1	0	0	0
9	416	0	1	0	0
Total	**2,284**	**3**	**5**	**1**	**4**

Con respecto al tipo de variantes genéticas de los cinco exones, se observó que el fenotipo purgativo presentó un mayor número de dbSNP (n=5), seguido de inserciones y duplicaciones (n=3) (Figura 17).

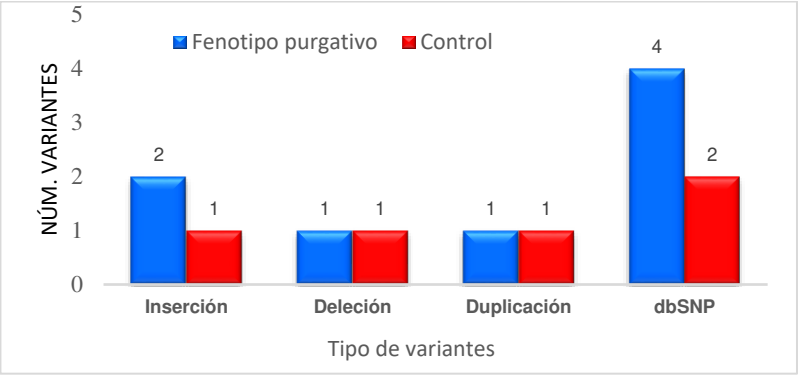

Figura 17. Tipo de variante variantes genéticas en el fenotipo purgativo. En el eje de la X se muestran el tipo de variantes. En el eje de la Y se muestran los números de variantes genéticas.

En relación con la clasificación de variantes sinónimas y no sinónimas, se reportó mayor número de no sinónimas en el fenotipo purgativo (n=5) y mayor número de variantes nuevas (n=3), las cuales no han sido reportadas en las bases públicas del genomAD y dbSNP. De manera interesante, no se observó ninguna variante sinónima en el fenotipo purgativo (Figura 18).

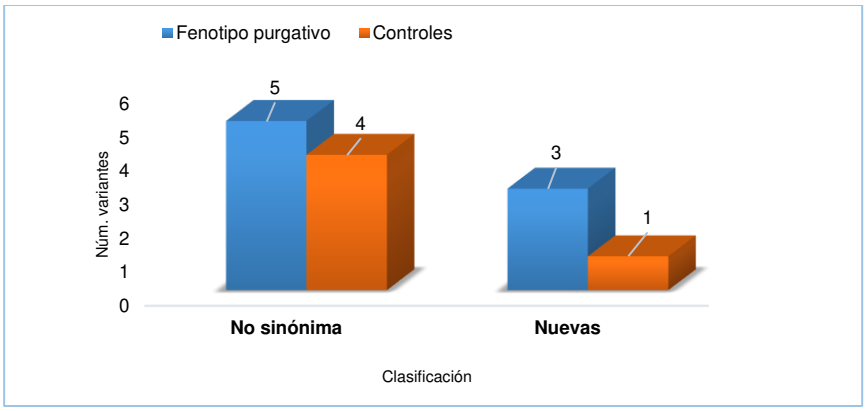

Figura 18. Variantes sinónimas, no sinónimas y nuevas en el fenotipo purgativo. En el eje de la X se muestran la clasificación de las variantes genéticas. En el eje de Y se reporta el número de variantes genéticas.

En el análisis de los cinco exones del gen, se realizó la alineación de las secuencias de los pacientes y el grupo control. Se observó dos variantes nuevas, como la g.295C>G localizada en el exón 1, donde se reportó que dos sujetos fueron homocigotos a la Guanina (Figura 19a). La variante c.1725InsA, localizada en el exón 8 se observó en sujeto homocigoto a la inserción de Adenina (Figura 19b). Cabe señalar que las variantes nuevas fueron verificadas en las bases públicas de genomAD y dbSNP y no han sido reportadas.

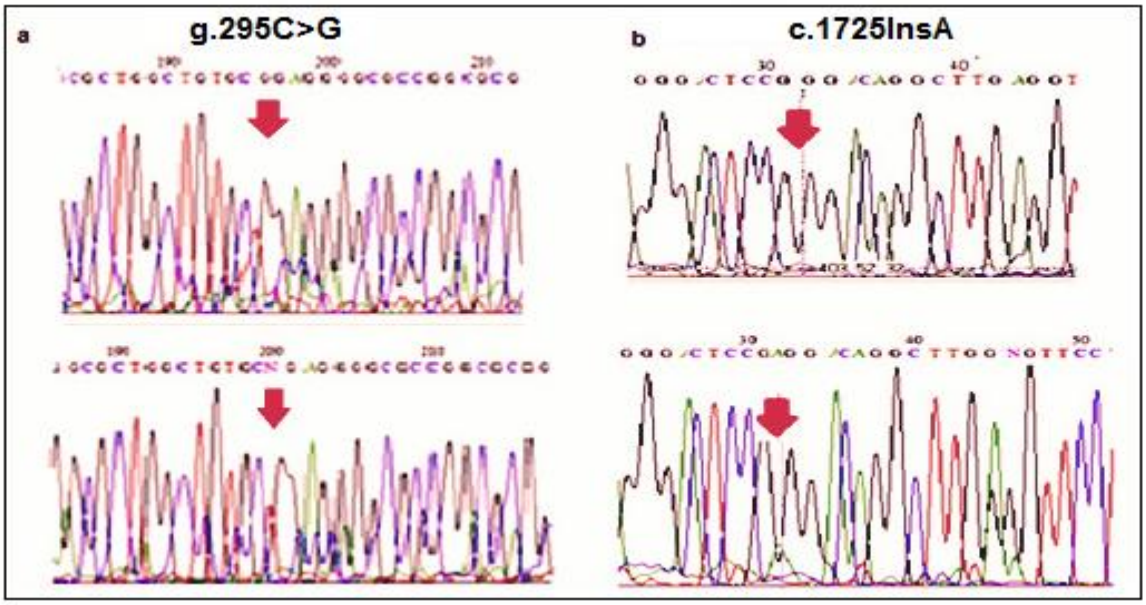

Figura 19. Electroferogramas de las variantes nuevas identificadas en el fenotipo purgativo y el grupo control. En el panel (a) se muestra la variante g.295C>G, en la parte superior se presenta el alelo con la variante C y en la parte inferior el alelo G. En el panel (b) se muestra la variante c. 1725InsA, la parte superior muestra la deleción y en la parte inferior se reporta la Inserción de A. La flecha roja indica el sitio del cambio de nucleótido.

Se reportó de una variante no sinónima, localizada en el exón 9 del gen *SLC6A4*, en tres sujetos del fenotipo purgativo, los cuales fueron homocigotos para la 1273T (Figura 20), el cambio de aminoácido de Isoleucina a Valina (I425V), no afecta la longitud de la proteína, y en el análisis de la predicción de la proteína se reportó como tolerante y benigna (SIFT=0.63; Polyphen=0.06).

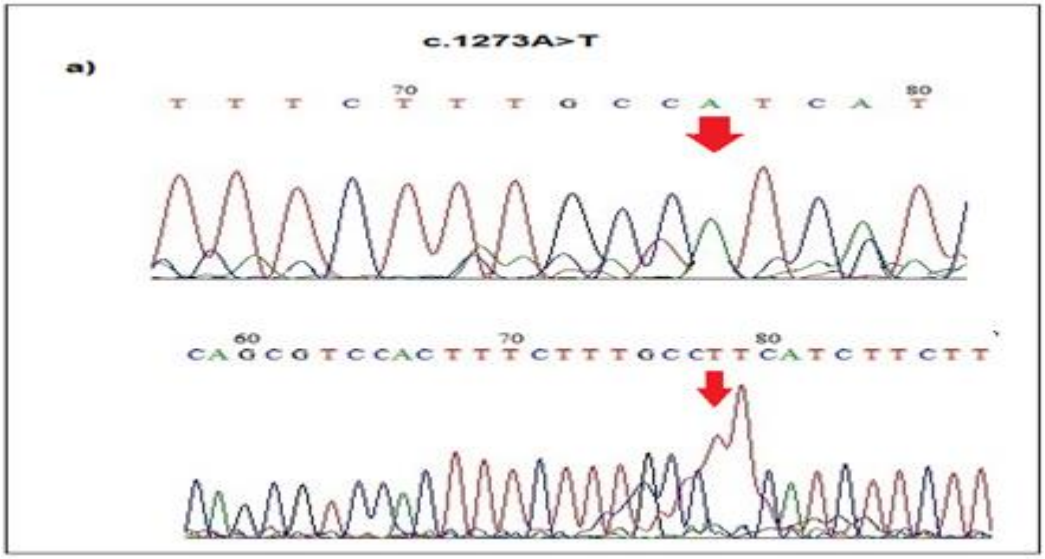

Figura 20. Electroferograma de la variante no sinónima en el fenotipo purgativo y el grupo control. Se muestra la variante c.1273A>T. En la parte superior se reporta el alelo A y en l parte inferior se observa el alelo T. La flecha roja indica el sitio del cambio de nucleótido.

Se observaron cinco SNPs que estuvieron presentes en los 50 sujetos control como en las 50 mujeres del fenotipo purgativo. Se observó un SNP nuevo g.136delC en el exón 1 (Figura 21a), de manera interesante, la variante no ha sido reportada en las bases públicas del Proyecto de 100 Genomas, tampoco en las bases del exoma. Además, se reportaron no sinónimas, como la c.139_140InsAC en el exón 2, está inserción nucleotídica predice un cambio de aminoácido (p.T47fs) que afecta el desplazamiento de marco de lectura en la traducción (Figura 21b). Otro fue la c.1179dupA, localizada en el exón 3, y el cambio de aminoácido (p.V394C) afecta la longitud de la secuencia de la proteína transportadora SERT (Figura 21c). También, se observaron dos variantes SNPs localizadas en el exón 2, como la c.148G>C (Figura 21d) y el cambio de aminoácido (V50L) no afecta la longitud de la proteína, sin embargo, en el análisis de la predicción de la proteína se reportó como tolerante y benigna (SIFT: 0.32; Polyphen=0.059). Otra fue la c.121C>T, que el cambio de aminoácido (G41A) da como resultado una secuencia de

aminoácidos diferente, pero conserva la longitud de la proteína (Figura 21e), sin embargo, de acuerdo a los análisis de la predicción de la proteína se reportó como deletérea (SIFT=0.04) y benigna (Polyphen=0.23).

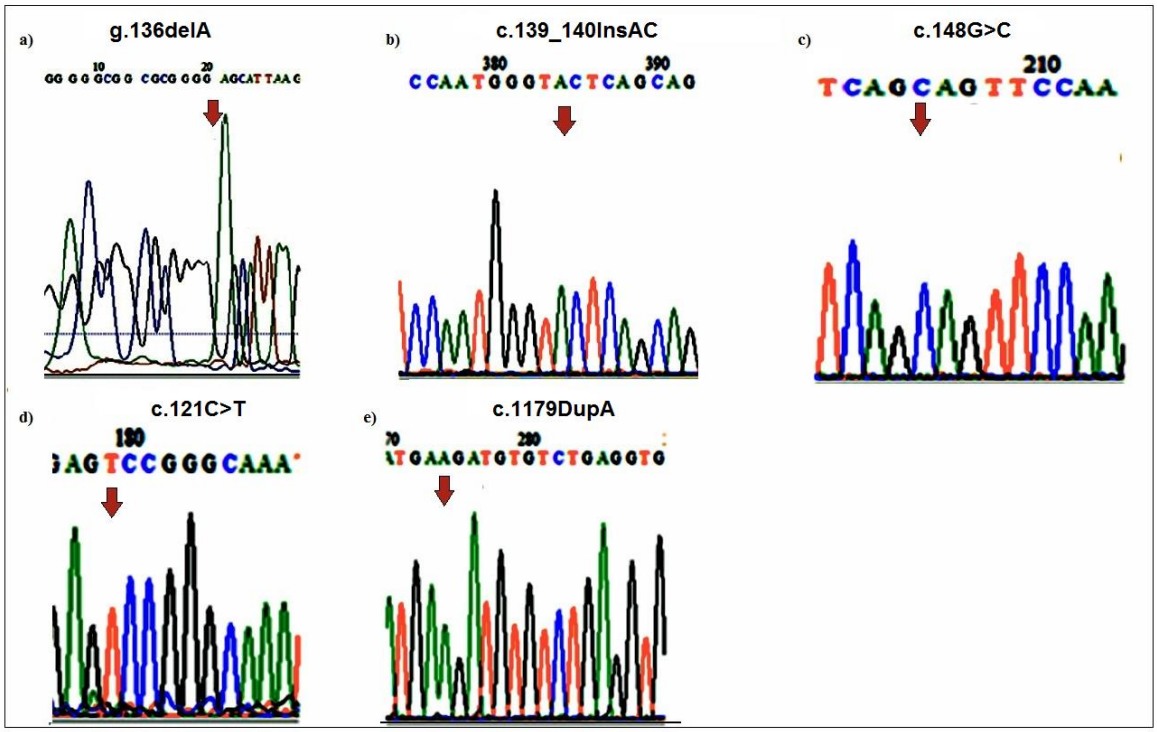

Figura 21. Electroferogramas de los SNPs compartidos en el fenotipo purgativo y el grupo control. En el panel (a) se muestra la variante g.136delC; (b) la c.139_140InsAC; (c) la variante c.148G>C; (d) la c.121C>T; (e) la c.1179DupA. La flecha roja indica el sitio del cambio de nucleótido

9.3.1. Variantes raras y comunes en el fenotipo purgativo

En la tabla 22 de muestran las variantes identificadas. Como se puede observar no se identificó ninguna variante rara en la muestra estudiada. Sin embargo, logramos observar 3 variantes de baja frecuencia en el fenotipo purgativo y 5 variantes genéticas comunes que fueron observadas en el fenotipo restrictivo y el grupo control.

Así mismo, se muestra el mapa del gen *SLC6A4*, con la localización de las variantes que se identificaron en los cinco exones del gen en el fenotipo purgativo (Figura 22).

Tabla 22. Frecuencias del alelo menor en el fenotipo purgativo

				Predicción		No. de sujetos Frecuencia alelo menor MAF	
Región del gen	**Referencia dbSNP**	**Cambio nucleótido**	**Aminoácido**	**SIFT**	**PolyPhen**	**Fenotipo purgativo (n=50)**	**Controles (n=50)**
Exon 1	New	g.136delC	-	-	-	1	1
Exón 1	New	g.295C>G	-	-	-	0.02	0
Exon 2	rs769651028	c.139_140insAC	p.T47Sfs	-	-	1	1
Exon 2	rs202152288	c.148G>C	p.V50L	Tolerant	Benign	1	1
Exon 2	rs140436169	c.121C>T	p.G41A	Deleterious	Damaging	1	1
Exon 3	rs34542731	c.1179dupA	p.V394fs	-	-	1	1
Exon 8	New	c.1725InsA	-	-	-	0.01	0
Exon 9	rs28914832	c.1273A>T	p.I425V	Tolerant	Benign	0.03	0

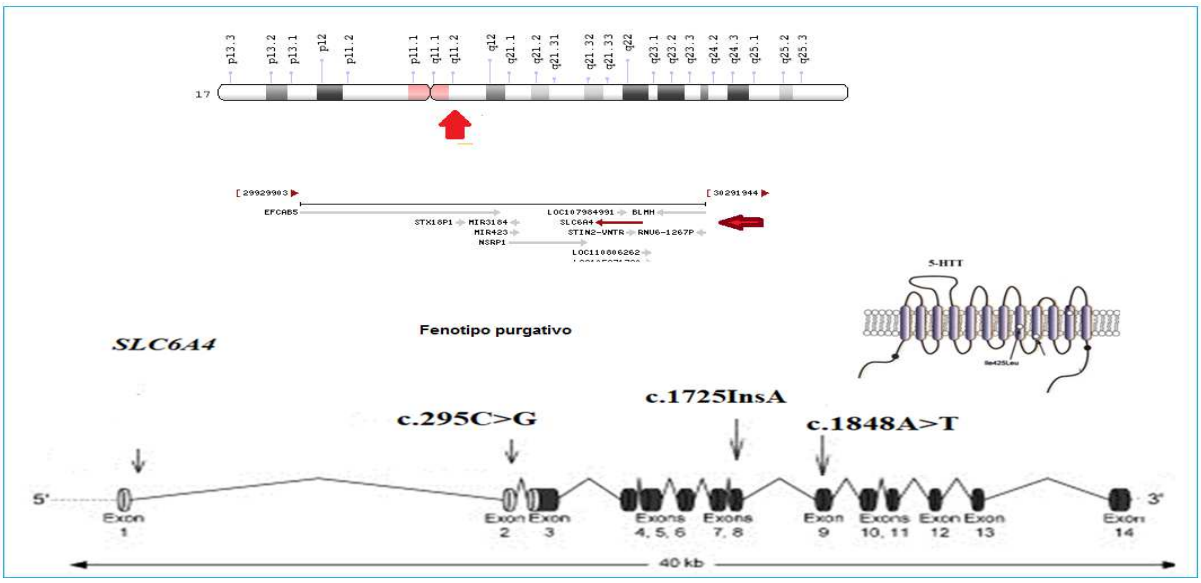

Figura 22. Localización de las variantes genéticas en los cinco exones del gen *SLC6A4* en el fenotipo purgativo. En la parte superior, se encuentra el cromosoma 17, donde se señala con la flecha roja la ubicación del gen 17q11.1. En la parte inferior, se representa el gen *SLC6A4* con 14 exones y se reportan las variantes genéticas identificadas en los exones del gen. En la parte derecha se muestra la proteína transportadora de serotonina SERT.

10. DISCUSIÓN

La ANR y BNP es un trastorno complejo, con mayor incidencia hacia las mujeres, dado que presentan mayor preocupación por la figura y el peso, además, de la presión social por el ideal a la delgadez y las críticas constantes del cuerpo, es más frecuente que ocurra en las mujeres, lo que contribuye a la baja autoestima y la susceptibilidad a desarrollar ANR o BNP (Méndez et al., 2008; Vargas et al., 2021). Otro factor que se encuentra involucrado en la AN y BN son los factores genéticos.

Estudios previos, han identificado variantes raras y comunes en el gen *SLC6A4* asociadas con ANR y BNP (Calati et al., 2011; Camarena et al., 2018; Lauzurica et al., 2003); sin embargo, los resultados no son concluyentes. La mayoría de los investigadores que estudian la genética de la AN y BN coinciden en que existen otras variantes genéticas que pueden ser raras o de baja frecuencia que tienen mayor impacto en el fenotipo, las cuales pueden ser identificadas por estudios de secuenciación. En este estudio, se reportan los resultados de la secuenciación por Sanger en cinco exones candidatos del gen *SLC6A4* en individuos del fenotipo restrictivo, purgativo y un grupo control.

Variantes del gen *SLC6A4* en el fenotipo restrictivo

Los hallazgos en el presente estudio, identificaron en el fenotipo restrictivo variantes de baja frecuencia (g.130delA, C.268T>A, C.411G>A, c.1149C>T, c.1164G>A y c.170G>A) no se reportaron variantes raras, lo cual pudo deberse al tamaño de la muestra. Del mismo modo, se identificaron variantes comunes (g.136delC, c.149_140AC; c.1179DupA, c.148G>C y c.121C>T) en los fenotipos restrictivo, purgativo y en el grupo control, las cuales ya han sido reportadas en otras poblaciones, en la población mexicana se reportan como no polimórficas las cuales pudieran no estar relacionadas con los TCA. Estudios previos han encontrado diferencias en las frecuencias alélicas de variantes genéticas en el gen *SLC6A4* en otras poblaciones (Gibbs et al., 2003; Haberstick et al., 2015; Murdoch et al., 2013). Por lo que, en la población mestiza mexicana, observamos la presencia de variantes de baja frecuencia, posiblemente, diferencias interindividuales entre las poblaciones (Lurescia et al., 2016; Ortega 2014).

Por otra parte, dentro de un marco evolutivo, las frecuencias de los alelos reflejan antiguas adaptaciones genéticas (migraciones, cuello de botella) que han cambiado debido a las diferencias en el medio ambiente y el estilo de vida alimentaria entre las

poblaciones (Di Rienzo and Hudson., 2005). Se considera que las variantes raras y de baja frecuencia son evolutivamente recientes, debido a que mantienen un equilibrio entre la selección natural positiva y la deriva génica de los alelos entre las poblaciones. De manera interesante, la deriva génica no toma en cuenta el beneficio o daño que un alelo proporciona a su portador, lo que significa que probablemente un alelo resultaría ventajoso (como los que confieren mayor expresión o ganancia de función a la proteína SERT), pudiera desaparecer o bien fijarse en la población únicamente por azar, alcanzando frecuencias alélicas comunes. Sin embargo, las variantes que pueden ser perjudiciales podrían ser eliminadas con mayor rapidez entre las poblaciones, por las presiones selectivas naturales que actúan sobre las variantes, lo que conlleva, a la observación de un amplio espectro de frecuencias alélicas que sustentan los diferentes fenotipos complejos en las enfermedades (Bomba et al., 2017; Eyre-Walker., 2010; Taub and Page, 2016).

De manera interesante, se ha sugerido que los fenotipos complejos que se presentan en edades tempranas como el autismo, pudieran presentar un mayor número de variantes raras y de baja frecuencia en rasgos fuertemente influenciados por la selección natural negativa, en comparación con los trastornos de aparición tardía como la esquizofrenia o el trastorno bipolar que podrían tener asociación con un mayor número de variantes comunes (Lee et al., 2012; de Girolamo et al., 2016; Park et al., 2011). Por lo tanto, se sugiere que el fenotipo restrictivo en anorexia podría estar sesgado hacia una mayor presencia de variantes de baja frecuencia, dado que tiene un inicio temprano del trastorno. En otros hallazgos, se ha documentado sobre la presencia de variantes raras y de baja frecuencia asociadas al fenotipo restrictivo en poblaciones caucásicas, las cuales podrían estar sobre expresadas en áreas cerebrales del núcleo paraventricular y la amígdala, que están relacionadas con la señal de saciedad y las emociones (Cui et al., 2013; Howard et al., 2020; Lutter et al., 2017; Negraes et al., 2017).

Previamente se estudió la variabilidad en genes relacionados con la neurotransmisión neuronal y reportó que el gen *SLC6A4* presentó mayor número de variantes no sinónimas (n=15) en comparación con el gen transportador de aminas *SLC18A2* (n=4); sin embargo, se observó mayor número de variantes no codificantes en el *SLC18A2* (n=17) que el *SLC6A4* (n=5), lo que podría indicar que la selección natural probablemente esté actuando para preservar la estructura de aminoácidos de la proteína transportadora a 5-HTT/SERT (Glatt et al., 2001; Yates et al., 2013). Lo anterior puede deberse al papel central que tiene la proteína SERT en el sistema nervioso central, como

el mantenimiento de la homeostasis serotoninérgica en las áreas del hipotálamo relacionadas con la señal de saciedad y regulación de las emociones en los individuos.

En el fenotipo restrictivo se identificaron variantes genéticas en los cuatro exones, no se observó ninguna variante en el exón 9, pudiera ser un locus sin riesgo genético para el fenotipo; sin embargo, sería interesante su confirmación en una muestra de mayor tamaño. De manera interesante, un estudio documentó de una variante rara (I425V) localizada en el exón 9 del *SLC6A4* en una familia con múltiples afectados con rasgos obsesivos-compulsivos y anorexia nervosa en población caucásica, lo que pudiera indicar que, para nuestra población mestiza mexicana, el exón 9 no representó un sitio de riesgo en el fenotipo de anorexia restrictiva (Ozaki et al., 2003).

Además, se identificaron variantes sinónimas tipo SNP, el c.411G>A, localizado en el exón 3 y en el exón 8 el c.1149C>T y c.1164G>A. Cabe señalar que hasta la fecha no se tienen reportes sobre estas variantes genéticas asociadas con algún fenotipo en particular. Sin embargo, se ha documentado que las variantes sinónimas podrían afectar la expresión y la función de la proteína transportadora a 5-HTT/SERT, como el empalme de RNAm y provocar una disminución de la velocidad en la traducción o retrasar y detener el alargamiento de la cadena peptídica en el ribosoma, lo cual podría tener un efecto negativo sobre la proteína transportadora a 5-HTT/SERT, dando como consecuencia una baja afinidad al sustrato 5-HT (Chen et al., 2001; Pagani et al., 2005; Shabalina et al., 2013). Es interesante señalar que dichas variantes se reportaron en estado homocigoto y no fueron observadas en el grupo control.

Además, se identificó la variante no sinónima c.268T>A en el fenotipo restrictivo, que fue catalogada como deletérea y dañina, ya que el reemplazo del aminoácido Leucina, que pertenece a la clase neutra hidrofóbica, cambia por Fenilalanina, la cual se encuentra en la clase de aminoácidos aromáticos, sustitución que pudiera alterar la similitud química en los dominios transmembranales hidrofóbicos (TMD) como las TDM1, TDM5 y TDM7 de la proteína transportadora SERT misma que podría alterar la afinidad al sustrato 5-HT (Barker et al., 1999; Humphrey et al., 1994; Laursen et al., 2018). Donde la Adenina podría ser considerada como una variante causal, ya que da origen a una alteración biológica confiriendo vulnerabilidad genética al fenotipo restrictivo (Howard et al., 2020; Pearl., 2000; Spirtes., 2000).

En el estudio se identificaron variantes nuevas para el fenotipo restrictivo, la g.130delA y c.1740G>A y la variante genética g.136delC que también se observó en el

grupo control, las cuales no se encuentran reportadas en las bases genéticas públicas. En particular, podrían tratarse de variantes privadas para nuestra población, ya que no se encuentran reportadas en las bases públicas del GenBank. (Silva-Zolezzi et al., 2009). Hasta la fecha, se sabe poco sobre la distribución de variantes genéticas específicas en población mexicana; sin embargo, estas variantes pudieran ser específicas para nuestra población y podrían constituir un reservorio de variantes de riesgo en la etiología de diversas enfermedades, en particular, para el fenotipo restrictivo en anorexia (Lupski et al., 2013; Moreno et al., 2014).

Evidencias clínicas respaldan la hipótesis de una disfunción en el sistema serotoninérgico, donde se sugiere que pacientes del fenotipo restrictivo presentan un aumento de las concentraciones extracelulares de 5-HT y desequilibrio en los receptores post-sinápticos como 5-HT_{1A} y 5-Ht_{2A}, además de la vulnerabilidad genética del transportador a 5-HTT/SERT que podrían conferir ganancia o pérdida de su función, lo cual podría estar asociado con la disminución de su actividad y alterar la cascada de señalización de saciedad y exacerbar la psicopatología del fenotipo restrictivo, como la rigidez cognitivo conductual hacia el consumo de los alimentos, el sobre control de los impulsos y la preocupación excesiva de la imagen corporal, dando pie a realizar conductas restrictivas y conferir riesgo biológico para desarrollar el fenotipo restrictivo.

Como se sabe, el hambre y la saciedad se encuentran regulados por un conjunto de señales internas y externas que mantienen la homeostasis energética en el organismo. Además, las personas se esfuerzan por lograr un equilibrio energético, sin embargo, en los últimos años una porción de la población se encuentra en un balance energético positivo prolongado, con una ingesta calórica mayor que el gasto energético, lo que ha dado origen a la obesidad. En un marcado contraste se encuentran los individuos con ANR que realizan conductas de dietas restrictivas, niegan la presencia de señales típicas de hambre, posiblemente debido en parte a la percepción reducida de las señales de hambre y las ideaciones continuas sobre la delgadez. Los individuos con ANR tienden a la ansiedad; sin embargo, la restricción alimentaria tiene en ellos un efecto calmante y la actividad física que realizan de manera compulsiva funciona más como un estimulante a diferencia que la ingestión de alimentos. Lo anterior se refuerza por un estudio de GWAS que reportó una correlación genética positiva entre la actividad física y peso bajo (IMC=16) en ANR, lo que sugiere que el peso bajo pudiera estar también relacionado el componente genético (Watson et al., 2019). Además, la pérdida de peso después de la

recuperación, los pacientes presentan recaídas en la disminución del peso, lo que podría indicar que regresan a un punto de ajuste o estabilización del peso bajo, incluso después de la restauración del peso corporal durante las terapias de tratamiento (Muller et al., 2018).

Hasta la fecha en los estudios de GWAS y WES que se han realizado en la población caucásica con el fenotipo restrictivo no se ha incluido a la población mestiza mexicana (PGC-ED), por lo que se desconoce hasta la fecha, las variantes genéticas de riesgo en nuestra población. Sin embargo, los estudios de asociación genética han aportado información sobre variantes genéticas en el gen *SLC6A4* asociadas al fenotipo restrictivo, como variantes comunes (VNTR y alelo S) y una variante rara del SNP rs25531, como lo documentan dos meta-análisis en poblaciones caucásica y Asiática (Calati et al., 2011; Chen et al., 2015). Pero en población mestiza mexicana se ha informado de variantes en el gen *SLC6A4* asociadas a la ANR y BNP (Camarena et al., 2012, 2018; Hernandez-Muñoz et al., 2020). Por lo tanto, resulta necesario identificar las variantes genéticas e informar sobre las frecuencias alélicas en nuestra población, para conocer las variantes y analizar la función de estas en la susceptibilidad al desarrollo del trastorno alimentario en la población mexicana.

Variantes del gen *SLC6A4* en el fenotipo purgativo

El análisis en el fenotipo purgativo identificó variantes de baja frecuencia (g.295C>G, c.1725InsA y c.1273A>T) en los cinco exones del gen del *SLC6A4*. Sin embargo, no se identificaron variantes raras, debido a que el tamaño de muestra es pequeño. Se identificaron variantes comunes en el fenotipo purgativo, restrictivo y en el grupo control. Hasta la fecha, existen pocos estudios genéticos realizados para el fenotipo purgativo, lo que limita la información sobre las variantes de susceptibilidad. Sin embargo, previos reportes han informado de variantes comunes y raras asociados a la bulimia nervosa purgativa (Di Bella et al., 2000; Camarena et al., 2018; Steiger et al., 2011; Lauzurica et al., 2003). Este estudio, es el primero en informar sobre la presencia de variantes de baja frecuencia en la región codificante del gen *SLC6A4* en la población mestiza mexicana (Hernandez-Muñoz et al., 2020).

En el fenotipo purgativo encontramos una variante no sinónima, la c.1273A>T, la cual, ha sido reportada como tolerante y benigna, de acuerdo con los análisis de la predicción de la proteína. Sin embargo, se ha demostrado mediante estudios de transfección, que dicho polimorfismo al provocar un cambio del aminoácido (I425V)

confiere una ganancia de la función a la proteína SERT, ya que se reportó que la Valina mejora la actividad del transporte junto con un aumento de la densidad de la superficie celular y una mejor capacidad de transporte de 5-HT. También, se ha estudiado su actividad de hSERT mutado en líneas celulares, donde se ha reportado que cuando está presente la mutación 425V se presenta insensibilidad en los segundos mensajeros durante la internalización de la proteína en la membrana, (proteína quinasa G (PKG) y la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK)), lo que podría dar lugar a una rápida internalización y un aumento inmediato a la superficie de la membrana (Kilic et al., 2003; Prasad et al., 2005; 2009).

De forma interesante, nosotros reportamos asociación entre la variante Lg (5-HTTLPR/rs25531) y el fenotipo purgativo, variantes que han sido relacionadas con una menor expresión de la proteína SERT. Es posible que las variantes genéticas que afectan la expresión y la actividad de la proteína SERT podrían comprometer la capacidad de la proteína para modular su actividad en respuesta a las demandas ambientales y aumentar el riesgo a desarrollar el fenotipo purgativo, relacionado con una posible señalización alterada de 5-HT (Camarena et al., 2018; Hu et al., 2006). De manera interesante, la variante 1273T se observó en estado homocigoto y el grupo control no presentó este cambio de nucleótido.

Se ha planteado la hipótesis de menor tono serotoninérgico en el fenotipo purgativo para bulimia, lo cual se ha relacionado con la exacerbación de la impulsividad y de la ideación psicopatológica por la delgadez, lo cual se refleja con la presencia de episodios de atracones y purgas. Estudios clínicos, han documentado una baja densidad de la proteína SERT en áreas relacionadas con la saciedad y los estados emocionales como el núcleo paraventricular y la amígdala durante los episodios de purga en la bulimia nervosa. Del mismo modo, se sabe de la vulnerabilidad genética que contribuye al desarrollo del fenotipo purgativo (Frank et al., 2005; Pichika et al., 2012; Prassad et al., 2005; Steiger H., 2004).

De forma interesante, la variante 425V ha sido asociada con el espectro obsesivo-compulsivo, como lo demuestra un estudio genético basado en familias, donde se reportó una mayor transmisión de la variante 425V en pacientes con anorexia nervosa y el rasgo obsesivo compulsivo (Ozaki et al., 2003). Estas observaciones pueden indicar que varios trastornos psiquiátricos podrían compartir algunas variantes genéticas, como podría ser la p.I425V. Un estudio de WES identificó dos variantes raras (rs200039730, rs61754648) en los genes *ESRRA* y *HDAC4* en familias con múltiples personas afectadas con anorexia

nervosa y bulimia nerviosa purgativa que presentaban comorbilidad con ansiedad y rasgos obsesivo-compulsivos (Cui et al., 2013). Por lo tanto, la variante identificada en el *SLC6A4* podría tener un efecto pleiotrópico en el fenotipo purgativo y fenotipos, que coexisten con los trastornos alimentarios como los rasgos obsesivo-compulsivos ya que están bajo control de los impulsos, característico del fenotipo purgativo. Se ha sugerido, que las variantes que causan un efecto en la alteración de las proteínas pudieran predisponer al espectro de fenotipos serotoninérgicos complejos relacionados con una disfunción del sistema serotoninérgico (Antilla et al., 2018).

En este estudio, se identificaron dos SNPs nuevas, la g.295C>F y c.1725InsA en el fenotipo purgativo y la g.136delC que también se reportó en los controles, las cuales no se encuentran reportadas en las bases genéticas públicas. En particular, podrían tratarse de SNPs específicas de la población mestiza mexicana ya que, hasta la fecha, se sabe poco sobre la distribución de SNPs genéticas específicas de la población mestiza mexicana (Moreno et al., 2014).

El fenotipo restrictivo y purgativo son rasgos complejos, que involucran factores ambientales, familiares y genéticos que participan en conjunto para el desarrollo de los trastornos alimentarios. Sin embargo, los genes por sí solos no predicen que se desarrolle el trastorno alimentario, se deben incluir para su estudio otros factores que influyen en la vulnerabilidad, como son los antropométricos, rasgos psicopatológicos, conductas alimentarias, antecedentes de historia familiar, los cuales confieren riesgo para desarrollarlos (Bulik et al., 2007).

Es importante que se lleven a cabo estudios de secuenciación en cada población, ya que las frecuencias de los alelos varían de acuerdo con cada región geográfica, por lo que es necesario identificarlas en la población mestiza mexicana, ya que hasta la fecha no existen datos contundentes sobre las variantes genéticas de riesgo en nuestra población. Este estudio contribuye al conocimiento de las bases genéticas del fenotipo restrictivo y purgativo en la población mestiza mexicana.

Una estrategia utilizada en los estudios de secuenciación es la identificación selectiva de fenotipos homogéneos que sean clínicamente relevantes, para poder identificar los genes de riesgo. La aportación que tienen los estudios de secuenciación es el potencial de descubrir variantes causales que predisponen a enfermedades complejas, como lo son los trastornos alimentarios. El presente estudio logró identificar variantes de baja frecuencia como los que se identificaron en el fenotipo restrictivo (c.268T>A) y el

fenotipo purgativo (c.1273A>T), lo cual aporta evidencia a favor del *SLC6A4*, en la que la proteína a la que codifica participa en la señal de saciedad y regulación de las emociones.

Adicionalmente, identificamos variantes nuevas en nuestra población, y también se identificó variantes genéticas de riesgo en el fenotipo restrictivo (g.130delA, c.1740G>A) y el fenotipo purgativo (g.295C>Gc.1725InsA) en la población mestiza mexicana.

El estudiar la genética de los fenotipos restrictivo y purgativo en la población mestiza mexicana, nos ayudará a entender sobre el componente genético, para que en un futuro próximo se pueda elegir regímenes terapéuticos guiados por alelos de riesgo en nuestra población, ya que la proteína SERT es blanco terapéutico en el tratamiento farmacológico de estos trastornos.

11. CONCLUSIONES

1.-No se identificaron variantes raras en los fenotipos extremos.

2.-Se identificó variantes de baja frecuencia en el fenotipo restrictivo y purgativo de la población mestizo mexicana.

3.- Se detectaron variantes genéticas (1273A>T; 268T>A) que confieren poca afinidad al sustrato (p.I425V) o tener un efecto en la estructura química de la proteína (p.L90F), apoyando la hipótesis de una disfunción en la proteína transportadora de SERT en el desarrollo de los trastornos alimentarios.

4.- Se identificaron variantes nuevas en el fenotipo restrictivo (g.130delA; c.1740G>A) y purgativo (g.295C>G) que son particulares para la población mestizo mexicana y contribuyen a la vulnerabilidad genética de un TCA.

5.- Se identificó SNPs nuevos comunes en los fenotipos restrictivo, purgativo y el grupo control, los cuales constituyen un reservorio de la población mestizo mexicana.

6.- Nuestro estudio aporta información de variantes asociadas con el desarrollo de ANR y BNP en población mestizo mexicana.

12. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1.- El tamaño pequeño de la muestra resultó en un poder limitado para identificar variantes raras.

2.- Solo se secuenciaron cinco exones del gen, podría ser interesante explorar la secuencia completa de *SLC6A4*.

3.- No se incluyó a otros subtipos de trastornos alimentarios, que pueden pasar por alto algunos hallazgos sobre el papel de *SLC6A4* en los trastornos alimentarios.

13. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

1.- Analizar las variantes genéticas identificadas en una muestra independiente y mayor.

2.- Analizar la secuencia completa de SCL6A4 en todos los TCA.

3.- Realizar estudios de secuenciación de exoma completo (WES) en familias con trastornos alimentarios en la población mestiza mexicana.

4.-Vincular las variantes de riesgo con las vías biológicas en los trastornos de la conducta alimentaria.

5.- Realizar estudio de biología de sistemas, donde se integren los estudios psicológicos, la historia clínica, estudios genéticos, proteómicos y transcripcionales en los trastornos de la conducta alimentaria, que permita dilucidar la etiología y proponer tratamientos personalizados en los trastornos alimentarios

14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1000 Genomes Project Consortium Auton A., Brooks L. D., Durbin R. M., Garrison E. P., Kang H. M., et al. (2015). A global reference for human genetic variation. Nature 526 68–74.

Alcazar, G., Lora, E. y Berrio, M. E. Índice de masa corporal y percepción de la imagen corporal en estudiantes de enfermería. Index Enfermería. 2011; 20(1), 11-15.

Ali FR, Vasiliou SA, Haddley K, Paredes UM, Roberts JC, Miyajima F, et al. Combinatorial interaction between two human serotonin transporter gene variable number tandem repeats and their regulation by CTCF. J. Neurochem. 2010 Jan; 112(1):296-306.

Anttila, V., Bulik-Sullivan, B., Finucane, H. K., Walters, R. K., Bras, J., Duncan, L., Patsopoulos, N. A. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. Science. 2018; 360(6395), eaap8757.

Anderluh M, Tchanturia K, and Rabe S, Treasure J. Childhood obsessive-compulsive personality traits in adult women with eating disorders: Defining a broader eating disorder phenotype. Am. J. Psych. 2003; 160,242-247.

Ando, T., Komaki, G., Karibe, M., Kawamura, N., Hara, S., Takii, M. et al. 5-HT2A promoter polymorphism is not associated with anorexia nervosa in Japanese patients. Psych. Genet. 2001; 11(3), 157-160.

American Psychiatric Association (APA). 1994. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV). Washington: Am. Psych. Assoc.p.909.

Anderson HG. Hambre, apetito e ingesta alimentaria. En: Conocimientos actuales en nutrición. ILSI, Life Sciences Institute, Organización Panamericana de la Salud, Séptima Edición. ILSI Press, Washington. 1998: 15-21.

Audenaert K, Van Laere K, Dumont F, Vervaet M, Goethals I, Slegers G, Mertens J, Van Heeringen C, Dierckx R. Decreased 5-HT2a receptor binding in patients with anorexia nervosa. J Nucl Med. 2003; 44:163–169.

Bailer U, Frank G, Henry S, Price J, Meltzer C, Mathis C, Wagner A, et al. Exaggerated 5-HT1A but normal 5-HT2A receptor activity in individuals ill with anorexia nervosa. Biol Psych. 2007; 61:1090–1099.

Bailer U, Bloss C, Frank G, Price J, Meltzer C, Mathis C, et al. 5-HT1A receptor binding is increased after recovery from bulimia nervosa compared to control women and is associated with behavioral inhibition in both groups. Int. J. Eat Disord. 2011; 44(6):477-487.

Bansal V, Libiger O, Torkamani A, Schork N. Statistical analysis strategies for association studies involving rare variants. Nat. Rev. 2010; 11:773-785.

Barajas-Iglesias, B., Jáuregui-Lobera, I., Laporta-Herrero, I., & Santed-Germán, M. Á. Eating disorders during the adolescence: personality characteristics associated with anorexia and bulimia nervosa. Nutrición hospitalaria... 2017; 34(5), 1178-1184.

Bardone-Cone, A. M., Joiner Jr, T. E., Crosby, R. D., Crow, S. J., Klein, M. H., Le Grange, D., Wonderlich, S. A. Examining a psychosocial interactive model of binge eating and vomiting in women with bulimia nervosa and subthreshold bulimia nervosa. Beh. Res.Ther. 2008; 46(7), 887-894.

Barker E.L., Moore K.R., Rakhshan F., Blakely R.D. Transmembrane domain I contributes to the permeation pathway for serotonin and ions in the serotonin transporter. J. Neurosci. 1999; 19:4705–4717

Barnett IJ, Lee S, Lin X: Detecting rare variant effects using extreme phenotype sampling in sequencing association studies. Genet Epidemiol. 2013; 37: 142–151

Becanu S, Bulik C, Klump K, Fichter M, Halmi K, Kaplan A, et al. Linkage analysis of anorexia and bulimia nervosa cohorts using selected behavioral phenotypes as

uiantitative traits or covariates. Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatr. Genet. 2005; 139B (1):61-68.

Behar R, Manzo R, Casanova D. Trastornos de la conducta alimentaria y asertividad. Rev. Med. Chile. 2006; 134:312-319.

Beltran A. The slave trade in Mexico. Hispanic Am Hist. Rev. 1994; 24:412–431.

Benjet C, Mendez E, Borges G, Medina-Mora M.E. Epidemiología de los trastornos de la conducta alimentaria en una muestra representativa de adolescentes [Epidemiology of eating disorders in a representative sample of adolescents]. Salud Mental 2012; 35:483–490.

Benjet C, Borges G, Mendez E, et al. Eight-year incidence of psychiatric disorders and service use from adolescence to early adulthood: longitudinal follow-up of the Mexican Adolescent Mental Health Survey. Eur Child Adolesc Psychiatry 2016; 25:163–173.

Bergen A, van den Bree M, Yeager M, Welch R, Ganjei J, et al. Candidate genes for anorexia nervosa in the 1p33-36 linkage region: serotonin 1D and delta opioid receptor loci exhibit significant association to anorexia nervosa. Mol. Psych.2003; 8: 397-406.

Bienvenu, T., Lebrun, N., Clarke, J., Duriez, P., Gorwood, P., Ramoz, N. Exome sequencing in a familial form of anorexia nervosa supports multigenic etiology. J. Neur. Trnasmss. 2019; 126(11), 1505-1511.

Bradley, C. C., & Blakely, R. D. Alternative splicing of the human serotonin transporter gene. J. Neuroch. 1997, 69(4), 1356-1367.

Bradley, C. C., Blakely, R. D. Alternative splicing of the human serotonin transporter gene. J. Neuroch. 1997; 69(4), 1356-1367.

Borgers, A. J., Koopman, K. E., Bisschop, P. H., Serlie, M. J., Swaab, D. F., Fliers, E., Alkemade, A. Decreased serotonin transporter immunoreactivity in the human hypothalamic infundibular nucleus of overweight subjects. Front. Neurosc. 2014;(8) 106.

Bomba, L., Walter, K., Soranzo, N. The impact of rare and low frequency genetic variants in common disease. Genom. Biol. 2017; 18(1), 77.

Boraska V, Davis O, Cherkas L, Helder S, Harris J, et al. Genome-wide association analysis of eating disorder-related symptoms, behaviors, and personality traits. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2012; 159B (7):803-11.

Boraska V, Franklin C, Floyd J, Thornton L, Huckings L, et al. A genome-wide association study of anorexia nervosa. Mol. Psych. 2014; 19(10):1085-94.

Breithaupt, Lauren, Christopher Hubel, and Cynthia M. Bulik. Updates on genome-wide association findings in eating disorders and future application to precision medicine. Curr. Neuropharmacol. 2018; 16.8: 1102-1110.

Bruch H. Treatment in anorexia nervosa. Int J Psych. Psych.1982; 9: 303-12.

Bulik, C. M., Sullivan, P. F., Weltzin, T. E., & Kaye, W. H. Temperament in eating disorders. Int. Eat. Disord. 1995; 17(3), 251-261.

Bulik CM, Sullivan PF, Kendler KS. Heritability of binge-eating and broadly defined bulimia nervosa. Biological Psychiatry. 1998; 44: 1210–1218.

Bulik, CM. Ansiedad, depresión y trastornos alimentarios. En: Treasure, J, Schmidt, U, Van Furth, E (eds) Handbook of Eating Disorders.2003; Chichester, UK: Wiley, pp. 193 - 198.

Bulik C, Becanu S, Klump K, Fichter M, Halmi K, Keel P, et al. Selection of eating disorders phenotypes for linkage analysis. Am. J. Med. Genet Part B. 2005; 139B:81-87.

Bulik C, Sullivan P, Tozzi F, Furberg H, Lichtenstein P, et al. Prevalence, heritability, and prospective risk factors for anorexia nervosa. Arch Gen Psych. 2006; 63: 305–312.

Bulik, C. M., Berkman, N. D., Brownley, K. A., Sedway, J. A., & Lohr, K. N. Anorexia nervosa treatment: a systematic review of randomized controlled trials. Int. J. Eat. Disord. 2007; 40(4), 310-320.

Bulik, C. M., Thornton, L. M., Root, T. L., Pisetsky, E. M., Lichtenstein, P., & Pedersen, N. L. Understanding the relation between anorexia nervosa and bulimia nervosa in a Swedish national twin sample. Biol. Psych. 2010; 67(1), 71-77.

Bulik, C. M., Blake, L., Austin, and J. Genetics of eating disorders: What the clinician needs to know. Psych. Clin. 2019; 42(1), 59-73.

Caballero A., Sunday S., Halmi K. A comparison of cognitive and behavioral symptoms between Mexican and American eating disorders patients. Int J Eat Disord. 2003; 34: 136-41.

Calati R, Ronchi D, Rellini M. The 5-HTTLPR polymorphism and eating disorders: A meta-analysis. Int. Eat. Disord. 2011; 44:191-199.

Camarena B, González L, Hernández S, Caballero A. SLC6A4 rare variants associated with eating disorders in Mexican patients. J. Psych Res. 2012:46:1106-1107.

Camarena, B., Hernandez, S., Gonzalez, L., Flores, G., Luna, D., Aguilar, A., et al. Association Study between the Triallelic Polymorphism of SLC6A4 Gene and Eating Disorders. Am. J. Psych. Neurosc. 2018; 6(4), 104.

Cao, X., Xu, P., Oyola, M. G., Xia, Y., Yan, X., Saito, K. et al. Estrogens stimulate serotonin neurons to inhibit binge-like eating in mice. J. Clin. Invest. 2014; 124(10), 4351-4362.

Cassin, S.E. y von Ransom, K.M. Personality and eating disorders: a decade in review. Clin. Psych. Rev. 2005; 25(7), 895-916.

Chamberlain, S.R., Blackwell, A.D., Fineberg, N.A., Robbins, T.W., Sahakian, B.J. The neuropsychology of obsessive-compulsive disorder: the importance of failures in cognitive and behavioral inhibition as candidate endophenotypic markers. Neurosc. Biobehav. Rev. 2005; 29, 399–419.

Chamberlain, S. R., Stochl, J., Redden, S. A., & Grant, J. E. Latent traits of impulsivity and compulsivity: toward dimensional psychiatry. Psych. Medic. 2018; 48(5), 810-821.

Chakravarti, A. Population genetics—making sense out of sequence. Nat. Genet. 1999; 21(1, Supply) 56–60.

Chen W, Qian J, Pu D, Ge H, Wu J. The association of 5-HTTLPR gene polymorphisms and eating disorder: a meta-analysis. J. Psychol. Psych. 2015; 1.5(214):2161-0487.

Chen, J. J., Li, Z., Pan, H., Murphy, D. L., Tamir, H., Koepsell, H., & Gershon, M. D. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. J. Neurosc. 2001; 21(16), 6348-6361.

Chen, X., Margolis, K. J., Gershon, M. D., Schwartz, G. J., Sze, J. Y. Reduced serotonin reuptake transporter (SERT) function causes insulin resistance and hepatic steatosis independent of food intake. PloS one. 2012; 7(3), e32511.

Claes L, Vandereycken W, Vertommen H. Impulsivity-related traits in eating disorder patients. Person.individ. Differen. 2005; 39:739-749.

Cirulli E, Goldstein D. Uncovering the roles of rare variants in common disease though whole-genome sequencing. Nat. Rev. 2010; 11:415-425.

Cools, Roshan, Angela C. Roberts, and Trevor W. Robbins. Serotoninergic regulation of emotional and behavioural control processes. Trend. Cog. Sci.2008; 12.1: 31-40.

Collins, R. L., Brand, H., Karczewski, K. J., Zhao, X., Alföldi, J., Francioli, et al. An open resource of structural variation for medical and population genetics. In bioRxiv. 2019; p. 578674.

Compan, V., Laurent, L., Jean, A., Macary, C., Bockaert, J., Dumuis, A. Serotonin signaling in eating disorders. Wiley Interdisciplinary Reviews: Membr. Trans. Sign. 2012; 1(6), 715-729.

Conrad D, Keebler J, Depristo M, Lindsay S, Zhang Y, Casals F, et al. 1000 Genomes project variation in genome-wide mutation rates within and between human families. Nat. Genet. 2010; 43:712-714.

Cui H, Moore J, Ashimi S, Mason B, Drawbridge J. Eating disorder predisposition is associated with ESRRA and HDAC4 mutations. J. Clin. Invest. 2013;124(11): 4706-4713.

Cyders M, Smith G, Spillane N, Fischer S, Annus A, Peterson C. Integration of impulsivity and positive mood to predict risky behavior: development and validation of a measure of positive urgency. Psych. Ass. 2007;19(1), 107-18.

Dalley, JW, Everitt, BJ, Robbins, TW. Impulsivity, compulsivity, and top-down cognitive control. Neuron. 2011; 69, 680–694.

de Girolamo, G., Bani, M., Dagani, J., Ferrari, C., Pastore, A., & Signorini, G. Age of onset of bipolar disorders: A systematic review and meta-analysis. Eur. Psych. 2016; 33(S1), S56-S56.

Devlin B, Bacanu S, Klump K, Bulik C, Fichter M, et al. Linkage analysis of anorexia nervosa incorporating behavioral covariates. Hum Mol Genet. 2002; 11: 689-696.

Díaz-Marsá, M., Luis, J., Sáiz, J. A study of temperament and personality in anorexia and bulimia nervosa. J. Person. Disord. 2000; 14(4), 352-359.

Di Bella D, Catalano M, Cavallini MC, Riboldi C, Bellodi L. Serotonin trasporter linked polymorphic region in anorexia and bulimia nervosa. Mol Psych. 2000; 5:233-41.

Dickson S, Wang K, Krantz I, Hakonarson H, Goldstein D. Rare variants create synthetic genome-wide association. Plos. Biol. 2010; 8:1-12.

Di Rienzo A, Hudson RR. An evolutionary framework for common diseases: the ancestral-susceptibility model. Trends Genet. 2005; 21(11): 596–601.

Duhault, J., Lacour, F., Espinal, J., & Rolland, Y. Effect of activation of the serotoninergic system during prolonged starvation on subsequent caloric intake and macronutrient selection in the Zucker rat. Appetite. 1993; 20(2), 135-144.

Duncan, L., Yilmaz, Z., Walters, R., Goldstein, J., Anttila, V., Bulik-Sullivan, B., & Ripke, S. Genome-wide association study reveals first locus for anorexia nervosa and metabolic correlations. Am. J. Psych. 2017; 174(9), 850.

Eddy, K. T., Dorer, D. J., Franko, D. L., Tahilani, K., Thompson-Brenner, H., Herzog, D. B. Diagnostic crossover in anorexia nervosa and bulimia nervosa: implications for DSM-V. Am. J. Psych. 2008; 165(2), 245-250.

Ewens, W. J. The sampling theory of selectively neutral alleles. Theoret. Populat. Biol. 1972; 3(1), 87-112.

Eysenck, H., Sybil B. G. An improved short questionnaire for the measurement of extraversion and neuroticism. Lif. Sc. 1964; 3(10):1103-1109.

Eyre-Walker, A. Genetic architecture of a complex trait and its implications for fitness and genome-wide association studies. Proc. Nat. Acad. Sci. 2010; 107(suppl 1), 1752-1756.

Fahy T, Eisler, I. Impulsivity and eating disorders. Brit. J. Psych. 1993; 62(2):193-197.

Fairburn C, Harrrison P. Eating disorders. Lancet, 2003; 361:407-416.

Faraj, B. A., Olkowski, Z. L., Jackson, R. T. Expression of a high-affinity serotonin transporter in human lymphocytes. Int. J. Immunopharmacol. 1994; 16, 561–567.

Faus, G. Trastornos de la conducta alimentaria en varones.En M. A. Martínez-Martín (Ed.), Todo sobre los trastornos de la conducta alimentaria: Una visión multidisciplinar desde la experiencia y la evidencia científica (pp. 191-2014). Tarragona, España: Altaria, 2015.

Fineberg, N. A., Chamberlain, S. R., Goudriaan, A. E., Stein, D. J., Vanderschuren, L. J., Gillan, C. M., et al. New developments in human neurocognition: clinical, genetic and brain imaging correlates of impulsivity and compulsivity. CNS spectrums. 2014; 19(1), 69.

Flint. J. Greenspan R., Kendler K.S. How genes influence behavior. New York: Oxford University Press. 2010.

Flores, A. C., Romo, A. C. Sintomatología Obsesivo-Compulsiva en pacientes con Trastornos de la Conducta Alimentaria Una muestra de pacientes mexicanas. Liberaddictus. 2008; (102), 3-8.

Forney K, Haedt A, Keel P. The role of loss of control eating in purging disorder. Int. J. Eat. Disord. 2014; 47(3): 244-251.

Forrest L, Zhang Y, Jacobs M, Gesmonde J, Xie L, Honig B, et al. Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105:10338–10343.

Forrest LR, Rudnick G. The rocking bundle: a mechanism for ion-coupled solute flux by symmetrical transporters. Physiol. (Bethesda). 2009; 24:377–386.

Fowler, S., Bulik, C. Family environment and psychiatric history in women with binge-eating disorder and obese controls. Behaviour Change. 1997; 14: 1.

Frank G, Kaye H, Weltzin T, Perel J, Moss H, McConaha C, Pollice C. Altered response to meta-chlorophenylpiperazine in anorexia nervosa: support for a persistent alteration of serotonin activity after short-term weight restoration. Int J Eat Disord. 2001; 30(1):57–68.

Frank G, Kaye W, Meltzer C, Price J, Greer P, McConaha C, et al. Reduced 5-HT2A receptor binding after recovery from anorexia nervosa. Biol. Psych. 2002; 52(9):896-906

Frank G, Bailer UF, Henry S, Drevets W, Meltzer CC, Price JC, et al. Increased dopamine D2/D3 receptor binding after recovery from anorexia nervosa measured by positron emission tomography and [11C]raclopride. Biol Psych. 2005; 58:908–912.

Fuller R, Snoddy H. Serotonin Receptor Subtypes Involved in the Elevation of Serum Corticosterone Concentration in Rats by Direct- and Indirect-Acting Serotonin Agonists. Neuroendocrinol.1990; 52:206-211.

Fumeron F, Betoulle D, Aubert R, Herbeth B, Siest G, Rigaud D. Association of a functional 5HT transporter gene polymorphism with anorexia nervosa and food intake. Mol Psych. 2001; 6:9-10

García-García, E., Vázquez-Velázquez, V., López-Alvarenga, J. C., Arcila-Martínez, et al. Validez interna y utilidad diagnóstica del Eating Disorders Inventory en mujeres mexicanas. Salud. Pub. Mex. 2003; 45(3), 206-210.

Garner, D. M., Bemis, K. M. A cognitive-behavioral approach to anorexia nervosa. Cog. Ther.Res. 1982; 6(2), 123-150.

Garner, D. M. Pathogenesis of anorexia nervosa. Lancet. 1993; 5, 341-1631.

Galusca B, Costes N, Zito N, Peyron R, Bossu C, Lang F, et al. Organic background of restrictive-type anorexia nervosa suggested by increased serotonin(1A) receptor binding in right frontotemporal cortex of both lean and recovered patients: [(18)F] MPPF PET Scan study. Biol Psych. 2008. 64:1009–1013

Gianini L.M, White M.A, Masheb R.M. Eating pathology, emotion regulation, and emotional overeating in obese adults with binge eating disorder. Eat. Beh. 2013; 14:309-13.

Gibbs, R. A., Belmont, J. W., Hardenbol, P., Willis, T. D., Yu, F. L., Yang, H. M., et al. (2003). The international HapMap project.

Glatt, C. E., De Young, J. A., Delgado, S., Service, S. K., Giacomini, K. M., Edwards, R. H. Screening a large reference sample to identify very low frequency sequence variants: comparisons between two genes. Nat. Genet. 2001; 27(4), 435-438.

Goethals I, Vervaet M, Audenaert K, Van De Wiele C, Ham H, Vandecapelle M, Slegers G, et al,. Comparison of cortical 5-HT2A receptor binding in bulimia nervosa patients and healthy volunteers. Am J Psychiatry. 2004; 161:1916–1918

Gordon, J. Barnes, N. M. Lymphocytes transport serotonin and dopamine: agony or ecstasy? Trends Immunol. 2003; 24, 438–443.

Goldbloom, D. S., Garfinkel, P. E. The Serotonin Hypothesis of Bulimia Nervosa: Theory and Evidence. Canadian J. Psych. 1990; 35(9), 741–744.

Gorodezky, C., Alaez, C., Vázquez-García, M. N., de la Rosa, G., Infante, E., Balladares, S., Muñoz, L. The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. Hum. Immunol. 2001; 62(9), 979-991.

Gorwood, P., Blanchet-Collet, C., Chartrel, N., Duclos, J., Dechelotte, P., Hanachi, M., Rovere-Jovene, C. New insights in anorexia nervosa. Front. Neurosc. 2016;10, 256.

Grice D Halmi K, Fichter M, Strober M, Woodside D, et al. Evidence for a susceptibility gene for anorexia nervosa on chromosome 1. Am J Hum Genet. 2002; 70: 787-792.

Grigoroiu-Serbanescu M, Magureanu S, Milea S, Dobrescu I, Marinescu E. Modest familial aggregation of eating disorders in restrictive anorexia nervosa with adolescent onset in a Romanian sample. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2003; 12(Suppl 1):I47–I153

Haberstick, B. C., Smolen, A., Williams, R. B., Bishop, G. D., Foshee, V. A., et al. Population frequencies of the triallelic 5HTTLPR in six ethnicially diverse samples from North America, Southeast Asia, and Africa. Behav. Behav. Gen., 2015; 45(2), 255-261.

Haleem, D. J. Exaggerated feedback control decreases brain serotonin concentration and elicits hyperactivity in a rat model of diet-restriction-induced anorexia nervosa. Appet. 2009; 52(1), 44-50.

Halmi K, Sunday S, Strober M, Kaplan A, Woodside DB, et al. Perfectionism in anorexia nervosa: variation by clinical subtype, obsessionality, and pathological eating behavior. Am J Psych. 2000; 157:1799-1805.

Hardaway, J. A., Crowley, N. A., Bulik, C. M., Kash, T. L. Integrated circuits and molecular components for stress and feeding: implications for eating disorders. Gen. Brain. Behav. 2015; 14(1), 85-97.

Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stöber, G., Riederer, P., Bengel, D., & Lesch, K. P. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. J. Neuroch; 1996; 66(6), 2621-2624.

Hernández-Muñoz, S., Camarena-Medellin, B., González-Macías, L., Aguilar-García, A., Flores-Flores, G., Dominguez, D, et al. Sequence analysis of five exons of SLC6A4 gene in Mexican patients with anorexia nervosa and bulimia nervosa. Gene. 2020; 748, 144675.

Hinney A, Barth N, Ziegler A, Prittwitz V, Hamann A, Hennighausen K, et al. Serotonin transporter gene-linked polymorphic region: allele distributions in relationship to body weight and in anorexia nervosa. Life Sci. 1997; 6:PL295-303.

Hoek H, Hoeken V. Review of the prevalence and incidence of eating disorders. Int. J. Eat. Disord. 2003. 34:383-396.

Hoek HW. Review of the worldwide epidemiology of eating disorders. Curr. Opin. Psych. 2016,29:336-339.

Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein MJ. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. Science 1991; 254:579–580.

Hoffman E, Gagne D, Thornton L, Klump K, Brandt H, Crawford S, et al. Understanding the association of impulsivity, obsessions, and compulsions with binge eating and purging behaviors in anorexia nervosa. Eur. Eat. Disord. Review. 2012; 20(3).

Holland AJ, Hall A, Murray R, Russell GFM, Crisp AH. Anorexia nervosa: a study of 34 twin pairs and one set of triplets. British Journal of Psychiatry. 1984; 145:414–419.

Hollander E, Wong CM. Obsessive-compulsive spectrum disorders. J. Clin Psychiatry. 1995; 56(Suppl 4): 3–6; discussion 53–55.

Hollander E, Rosen J. Impulsivity. J Psychopharmacol. 2000; 14(2 Suppl 1): S39–S44.

Howard, D., Negraes, P., Voineskos, A. N., Kaplan, A. S., Muotri, A. R., Duvvuri, V., et al. Molecular neuroanatomy of anorexia nervosa. Sci. Repor. 2020; 10(1), 1-14.

Hu, X. Z., Lipsky, R. H., Zhu, G., Akhtar, L. A., Taubman, J., Greenberg, B. D., Murphy, D. L. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. Am. J. Hum. Genet. 2006; 78(5), 815-826.

Hübel, C., Leppä, V., Breen, G., & Bulik, C. M. Rigor and reproducibility in genetic research on eating disorders. Int. J. Eat. Disord. 2018; 51(7), 593-607.

Huckins, L. M., Hatzikotoulas, K., Southam, L., Thornton, L. M., Steinberg, J., Aguilera-McKay, F., Zeggini, E. Investigation of common, low-frequency and rare genome-wide variation in anorexia nervosa. Mol. Psych. 2018; 23(5), 1169-1180.

Humphreys, C. J., Wall, S. C., Rudnick, G. Ligand binding to the serotonin transporter: equilibria, kinetics, and ion dependence. Biochem. 1994; 33(31), 9118-9125.

Jackson, M., Marks, L., May, G. H., & Wilson, J. B. The genetic basis of disease. Ess. Biochem. 2018; 62(5), 643-723.

Jayanthi LD, Samuvel DJ, Blakely RD, Ramamoorthy S. Evidence for biphasic effects of protein kinase C on serotonin transporter function, endocytosis, and phosphorylation. Mol Pharmacol 2005; 67:2077–2087.

Jimerson DC, Lesem MD, Kaye WH, Brewerton TD. Low serotonin and dopamine metabolite concentrations in cerebrospinal fluid from bulimic patients with frequent binge episodes. Arch Gen Psych. 1992; 49:132-8

Jimerson, D. C., Wolfe, B. E., Metzger, E. D., Finkelstein, D. M., Cooper, T. B., Levine, J. M. Decreased serotonin function in bulimia nervosa. Arch. Gen. Psych. 1997; 54(6), 529-534.

Jorde, L.B., Bamshad, M. & Rogers, A.R. Using mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution. Bioensay. 1998; 20, 126–136.

Kasset, J. A., Gershon, E. S., Maxwell, M. E., Guroff, J. J., et al. Psychiatric disorders in the first-degree relatives of probands with bulimia nervosa. Am. J. Psych. 1989;146(11), 1468–1471.

Kaye WH, Ebert MH, Gwirtsman HE, Weiss SR. Differences in brain serotonergic metabolism between bulimic and no bulimic patients with anorexia nervosa. Am J Psych. 1984; 141: 1598-601?

Kaye, W. H., Gwirtsman, H. E., George, D. T., & Ebert, M. H. Altered serotonin activity in anorexia nervosa after long-term weight restoration: Does elevated cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid level correlate with rigid and obsessive behavior? Arch. Gen. Psych.1991; 48(6), 556-562.

Kaye, W.H., Barbarich, N.C., Putnam, K., Gendall, K.A., Fernstrom, J., Fernstrom, M., McConaha, C.W. and Kishore, A. Anxiolytic effects of acute tryptophan depletion in anorexia nervosa. International Journal of Eating Disorders, 2003; 33(3), pp.257-267.

Kaye W, Gendall K, Strober M. Serotonin neuronal function and selective serotonin reuptake inhyibitor treatment in anorexia and bulimia nervosa. Biol Psych. 1998; 44:825-828.

Kaye W, Gendall K, Fernstrom M, Fernstrom J, McConaha C, Weltzin T. Effects of acute tryptophan depletion on mood in bulimia nervosa. Biol Psych. 2000; 47:151-7.

Kaye W, Nagata T, Weltzin T, Hsu L, Sokol M, et al. Double blind placebo-controlled administration of flouxetine in restricting and restricting purgating type anorexia nervosa. Biol. Psych. 2001; 49(7):644-52.

Kaye, W. H., Barbarich, N. C., Putnam, K., Gendall, K. A., Fernstrom, J., Fernstrom, M., Kishore, A. Anxiolytic effects of acute tryptophan depletion in anorexia nervosa. Int. J. Eat. Disord. 2003; 33(3), 257-267.

Kaye, Walter. Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. Psycol. Behav. 2008, vol. 94, no 1, p. 121-135.

Kaye W, Fudge J, Paulus M. New insights into symptoms and neurocircuit function of anorexia nervosa. Nat. Rev. 2009; 10:573-584.

Kaye, Walter H., et al. Nothing tastes as good as skinny feels: the neurobiology of anorexia nervosa. Trends. Neurosc. 2013; 36(2): 110-120.

Keel, P. K., Fichter, M., Quadflieg, N., Bulik, C. M., Baxter, M. G., Thornton, L. Application of a latent class analysis to empirically define eating disorder phenotypes. Arch. Gen. Psych. 2004; 61(2), 192-200.

Keski A, Hoek H, Susser E, Linna M, Sihvola E, et al. Epidemiology and Course of Anorexia Nervosa in the Community. Am J Psych. 2007; 164 (8): 1259-65.

Kessler RC, Berglund PA, Chiu WT, et al. The prevalence and correlates of binge eating disorder in the World Health Organization World Mental Health Surveys. Biol Psych. 2013; 73:904–914.

Kiezebrink K, Mann ET, Bujac SR, Stubbins MJ, Campbell DA, Blundell JE. Evidence of complex involvement of serotoninergic genes with restrictive and binge purge subtypes of anorexia nervosa. World J Biol Psych. 2010; 11:824-33.

Kilic, F., Murphy, D. L., Rudnick, G. A human serotonin transporter mutation causes constitutive activation of transport activity. Molecular Pharmacology. 2003; 64(2), 440-446.

Kleifield E, Sunday S, Hurt S, Halmi K. The tridimensional personality questionnaire: an exploration of personality traits in eating disorders. J. Psych. Res. 1994; 28:413-423.

Klump KL, McGue M, Iacono WG. Age differences in genetic and environmental influences on eating attitudes and behaviors in preadolescent and adolescent female twins. Journal of Abnormal Psychology. 2000; 109:239–251

Klump K, Miller K, Keel P, McGue M, Iacono W. Genetic and environmental influences on anorexia nervosa syndromes in a population-based twin sample. Psychol Med. 2001; 31:737-40.

Kolar D, Mejía D, Mebarak M, Hoek W. Epidemiology of eating disorders in Latin America: a systematic review and meta-analysis. Curr. Opin. Psychi. 2016; 29:363-371.

Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Mar; 14(3):153-65. Epub 2013 Feb 6. Review. Erratum in: Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Mar; 14(3).

Kornreich, L., Shapira, A., Horev, G., Danziger, Y., Tyano, S., & Mimouni, M. CT Evaluation of the brain in patients with anorexia nervosa. American J. Neuroradiol. 1991; 12(6), 1213-1216.

Koskela AK-R, Sihvola E, Kauppinen T, Kaprio JA, Rissanen A. Serotonin transporter binding of [123I]ADAM in bulimic women, their healthy twin sisters, and healthy women: a SPET study. BMC Psych. 2007; 21:7–9.

Kraft J, Slager S, McGrath P, Hamilton S. Sequence analysis of the serotonin transporter and association with antidepressant response. Biol Psych. 2005; 58:374-381.

Kraft P, Zeggini E, Ioannidis JP. Replication in genome-wide association studies. Stat Sci 2009; 24:561–73.

Krishnamurthy H, Gouaux E. X-ray structures of LeuT in substrate-free outward open and apoin ward-open states. Nature. 2012; 481:469–474.

Kristensen, A. S., Andersen, J., Jørgensen, T. N., Sørensen, L., Eriksen, J., Loland, C. J., et al. SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. Pharmacol. Rev. 2011; 63(3), 585-640.

Kryukov, G. V., Shpunt, A., Stamatoyannopoulos, J. A., Sunyaev, S. R. Power of deep, all-exon resequencing for discovery of human trait genes. Proc. Nat. Acad.Sci.2009; 106(10), 3871-3876.

Lacey, J. H., & Evans, C. D. H. The impulsivist: A multi-impulsive personality disorder. British J. Addic. 1986; 81(5), 641-649.

Lander, E.S. The new genomics: global views of biology. Science 1996; 274, 536–539.

Laursen, L., Severinsen, K., Kristensen, K. B., Periole, X., Overby, M., Muller, H. K., et al. Cholesterol binding to a conserved site modulates the conformation, pharmacology, and transport kinetics of the human serotonin transporter. J. Biol. Chem. 2018; 293, 3510–3523.

Lavender, J. M., Wonderlich, S. A., Engel, S. G., Gordon, K. H., Kaye, W. H., Mitchell, J. E. Dimensions of emotion dysregulation in anorexia nervosa and bulimia nervosa: A conceptual review of the empirical literature.Clin. Psych. Rev. 2015, 40, 111-122.

Lee MD, Aloyo VJ, Fluharty SJ, Simansky KJ. Infusion of the serotonin (1B) (5-HT1B) agonist CP-93,129 into the parabrachial nucleus potently and selectively reduces food intake in rats. Psychopharmacol.1998; 136:304-7.

Lee SH, DeCandia TR, Ripke S, Yang J, Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium, International Schizophrenia Consortium, et al. Estimating the proportion of variation in susceptibility to schizophrenia captured by common SNPs. Nat Genet. 2012; 44:247–50

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature. 2016 Aug; 536(7616):285-91.

León-Vázquez, C. D. D., Rivera-Márquez, J. A., Bojorquez-Chapela, I., & Unikel-Santoncini, C. Variables associated with disordered eating behaviors among freshman students from Mexico City. Salud Pub. Mex. 2017.59, 258-265.

Lesch K, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin B, Murphy D, et al. Organization of the human serotonin transporter gene. J. Neural Transm. 1994. 95:157– 162.

Li, WenHsiung. Molecular evolution. Sinauer associates incorporated, 1997.

Li D, Lewinger JP, Gauderman WJ, Murcray CE, Conti D: Using extreme phenotype sampling to identify the rare causal variants of quantitative traits in association studies. Genet Epidemiol. 2011; 35: 790–799.

Lilenfeld R, Kaye W, Greeno C, Merikangas K, Plotnicov K, Pollice C, et al. A controlled family study of anorexia nervosa and bulimia nervosa: psychiatric disorders in first-degree relatives and effects of proband comorbidity. Arch. Gen. Psych. 1998; 55:603-610.

Lombardi, L., Blanchet, C., Poirier, K., Lebrun, N., Ramoz, N., Moro, M. R., Bienvenu, T. Anorexia nervosa is associated with Neuronatin variants. Psych. Gen. 2019; 29(4), 103-110.

Luque J, Herráez A. Biología molecular e ingeniería genética. Harcourt; 1ª edición. Madrid España 2001. Pag:275-284.

Lupski JR, Belmont JW, Boerwinkle E. Clan genomics and the complex architecture of human disease. Cell 2011; 147:32–43.

Lurescia, S., Seripa, D., & Rinaldi, M. Role of the 5-HTTLPR and SNP promoter polymorphisms on serotonin transporter gene expression: a closer look at genetic architecture and in vitro functional studies of common and uncommon allelic variants. Mol. Neurobiol. 2016; 53(8), 5510-5526.

Lutter M, Bahi E, Hannan C, Hofammann D, Acevedo S, et al. Novel and ultra-rare damaging variants in neuropeptide signaling are associated with disordered eating behavior. Plos One. 2017; 12(8):e0181556.

MacKenzie A, Quinn J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999 Dec 21;96(26):15251-5.

Martínez L, Fernandez T, Molina A, Ayan C, Bueno A, Capelo R. Prevalencia de trastornos de la conducta alimentaria en universitarios españoles y factores asociados: Proyecto uniHcos. Nutrición Hospitalaria. 2014; 30(4):927-934.

Mashuita S, Suzuki K, Murayama M, Nishiguchi N, Hishimoto A, et al. Serotonin transporter regulatory region polymorphism is associated with anorexia nervosa. Am J Med Gen. 2004; 128B:114-7.

Mason, B. L., Lobo, M. K., Parada, L. F., Lutter, M. Trk B signaling in dopamine 1 receptor neurons regulates food intake and body weight. Obesity. 2013; 21(11), 2372-2376.

Mazure, C. M., Halmi, K. A., Sunday, S. R., Romano, S. J., Einhorn, A. M. The Yale-Brown-Cornell eating disorder scale: development, use, reliability and validity. J. Psych. Res. 1994; 28(5), 425-445.

Medina-Mora I, Borges G, Lara-Muñoz C, Benjel C, Blanco J, Fleiz C, et al. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la encuesta nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. Salud. Ment. 2003; 26(4): 1-16.

Mela, D. J. Eating behaviour, food preferences and dietary intake in relation to obesity and body-weight status. Procc. Nutri. Sci. 1996; 55(3), 803-816.

Méndez, J. P, Vazquez VV, García G.E. Los trastornos de la conducta alimentaria. Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. 2008;65.6: 579-592.

Micali N, Hilton K, Natatani E, Heyman I, Turner C, Mataix-Cols D. Is childhood OCD a risk factor for eating disorders later in life? A longitudinal study.Psych. Medic. 2011; 41:2507–2513.

Moreno E, Benn B, Gravel S, Byrnes J. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. Sci. 2014; 344:1280-1285.

Monteleone P, Santonastaso P, Mauri M, Bellodi L, Erzegovesi S, Fuschino A, et al. Investigation of the serotonin transporter regulatory region polymorphism in bulimia

nervosa: relationships to harm avoidance, nutritional parameters and psychiatry comorbidity. Psychosom. Med. 2006; 68:99-103.

Munn-Chernoff, M. A., McQueen, M. B., Stetler, G. L., Haberstick, B. C., Rhee, S. H., Sobik, L. et al. Examining associations between disordered eating and serotonin transporter gene polymorphisms. Intern. J. Eat. Disord. 2012; 45(4), 556-561.

Munro, C., Randell, L., & Lawrie, S. M. An integrative bio-psycho-social theory of anorexia nervosa. Clin. Psych. Psychoth. 2017; 24(1), 1-21.

Murdoch J, Speed W, Pakstis A, Heffelfinger C, Kidd K. Worldwide population variation and haplotype analysis at the serotonin transporter gene SLC6A4 and implications for association studies. Biol. Psych. 2013; 1-7.

Murphy, D. L., Fox, M. A., Timpano, K. R., Moya, P. R., Ren-Patterson, R., Andrews, A. M., ... & Wendland, J. R. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. Neuropharm. *2008; 55*(6), 932-960..

Murphy D, Moya P. Human serotonin transporter gene (SLC6A4) variants. Their contributions to understanding pharmacogenomic and other funtional GXG and GxE differences in health and disease. Curr. Opin. Pharm.2011. 11(1):3-10.

Nakken S, Alseth I, Rognes T. Computational prediction of the effects of non-sinonymous single nucleotide polymorphism in human DNA repair genes. Neurosc. 2007; 145(4):1273-1279.

Naessen, S., Carlström, K., Holst, J. J., Hellström, P. M., Hirschberg, A. L. Women with bulimia nervosa exhibit attenuated secretion of glucagon-like peptide 1, pancreatic polypeptide, and insulin in response to a meal. Am. J. Clin. Nutr. 2011; 94(4), 967-972.

Negraes, P. D., F. R. Cugola, R. H. Herai, C. A. Trujillo, A. S. Cristino, T. Chailangkarn, A. R. et al. Modeling Anorexia Nervosa: Transcriptional Insights from Human iPSC-Derived Neurons. Trans Psych. 2017; 7 (3): e1060

Nishimura, H., Komaki, G., Ando, T., Nakahara, T., Oka, T., Kawai, et al. Psychological and weight-related characteristics of patients with anorexia_nervosa restricting type who later develop bulimia nervosa.Biol. Psycho-Soc. Med.2008; 2(1), five.

Orozco G, Barret J, Zeggini E. Synthetic associations in the context of genome-wide association scan signals. Hum. Mol. Genet. 2010; 19(R2):R137-R144.

Ortega VE, Meyers DA. Pharmacogenetics: implications of race and ethnicity on defining genetic profiles for personalized medicine. J Allergy Clin Immunol. 2014; 133(1): 16–26.

Ozaki N, Goldman D, Kaye W, Plotnicov K, Greenberg B, Lappalainen J, et al. Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype. Mol. Psych. 2003; 8:933-936.

Ozarac N, Santha B, Hoffman B. Alternative non-coding exon support serotonin transporter mRNA expression in the brain and gut J. Neurochem. 2002; 82(2):336-340.

Paez F, Jimenez A, Lopez A, Raull J, Soto H, et al. Estudio de validez de la traducción al castellano de la escala de Impulsividad de Plutchik. Salud Mental V. 1996; 19:10-12.

Pagani, F., Raponi, M., Baralle, F. E. Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution. Procc. Nat. Acad. Sciens. 2005; 102(18), 63.

Park JH, Gail MH, Weinberg CR, Carroll RJ, Chung CC, Wang Z, et al. Distribution of allele frequencies and effect sizes and their interrelationships for common genetic susceptibility variants. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108:18026–31.

Pearl, Judea. Causality: Models, reasoning and inference cambridge university press. Cambridge, MA, USA, 2000, vol. 9, p. 10-11.

Peláez-Fernández MA, Labrador FJ, Raich RM. Prevalence of eating disorders among adolescent and young adult scholastic population in the region of Madrid (Spain). J Psych. Res 2007; 62 (6): 681-90.

Pichika R, Buchsbaum M, Bailer U, Hoh C, DeCastro A, Buchsbaum B, Kaye W. Serotonin transporter binding after recovery from bulimia nervosa. Int. J Eat. Disor. 2012; 45(3), 345-352.

Pino, J. L., López, M. A., Moreno, A. A. y Faúndez, P. Percepción de la imagen corporal, del estado nutricional y de la composición corporal de estudiantes de nutrición y dietética de la Universidad del Mar Talca, Chile. Rev. Chilena Nutr. 2010; 37(3):321-328.

Pike KM, Hoek HW, Dunne PE. Cultural trends and eating disorders. Curr Opin Psych. 2014; 27:436–442

Plomin R, DeFries JC, McClearn GE, Rutter M. Behavioral Genetics. 3. W.H. Freeman Co; New York: 1994

Polsinelli GN, Levitan RN, De Luca V. 5-HTTLPR polymorphism in bulimia nervosa: a multiple-model meta-analysis. Psych.Genet. 2012 Oct; 22(5):219-25.

Porcelli, S., Fabbri, C., & Serretti, A. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with antidepressant efficacy. Eur. Neuropsychopharm. 2012; 22(4), 239-258.

Pothos EN, Hernandez L, Hoebel BG. Chronic food deprivation decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens: implications for a possible neurochemical link between weight loss and drug abuse. Obesity Research.1995; 3: 525S-529S.

Pramod, A. B., Foster, J., Carvelli, L., & Henry, L. K. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. Mol. Asp. Med. 2013, 34(2-3), 197-219.

Prasad, H. C., Zhu, C. B., McCauley, J. L., Samuvel, D. J., Ramamoorthy, S., Shelton, R. et al. Human serotonin transporter variants display altered sensitivity to protein kinase G and p38 mitogen-activated protein kinase. Procc. Nat. Academ. Sci. 2005; 102(32), 11545-11550.

Prasad H, Steiner J, Sutcliffe J, Blakely R. Enhanced activity of human serotonin transporter variants associated with autism. Phil. Trans. R. Soc. 2009; 364:163-173.

Pritchard J. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases. Am. J. Hum. Genet. 2001; 69:124-137.

Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, et al. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:2542–2546.

Ramamoorthy S, Blakely R. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulates by psychostimulantes. Science. 1999; 285; 5428:763-765.

Ramamoorthy, S., Shippenberg, T. S., Jayanthi, L. D. Regulation of monoamine transporters: Role of transporter phosphorylation. Pharmac. Theraph. 2011; 129(2), 220-238.

Rangel V, Rivas F, Torres M, Jaloma A, Gallegos M, Lopez J, et al. Allele frequency distributions of six Amp-FLPS (D1S80, APO-B, VWA, TH01, CSF1P0, and HPRTB) in a Mexican population. Forens Sci Int. 1999; 105(2):125-129.

Raychaudhuri, S. Mapping rare and common causal alleles for complex human diseases. Cell. 2011; 147(1), 57-69.

Qian, Y., Melikian, H. E., Rye, D. B., Levey, A. I. Blakely, R. D. Identification and characterization of antidepressant- sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. J. Neurosci.1995; 15, 1261–1274.

Reich D, Lander E. On the allelic spectrum of human disease. Tren. Genet. 2001; 17(9):502-510.

Ribasés, M., Gratacòs, M., Fernández-Aranda, F., Bellodi, L., Boni, C., Anderluh, M., et al. Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. Hum. Mol. Gen. 2004; 13(12), 1205-1212.

Rinne T, Westenberg H, den Boer J, van den Brink W. Serotonergic blunting of meta-chlorophenylpiperazine (m-CPP) highly correlates with sustained childhood abuse in impulsive and autoaggressive female borderline patients. Biol Psych. 2000; 47:548-56.

Romero-Martínez, M., Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: metodología y perspectivas. Salud pública de México, 61(6, nov-dic), 917-923.

Rutherford J, McGuffin P, Katz RJ, Murray RM. Genetic influences on eating attitudes in a normal female twin pair population. Psychol Med. 1993; 23:425–36

Rybakowski F, Slopiena A, Dmitrzak-Weglarzb M, Czerskib P, Rajewskia A, Hauserb J. The 5-HT2A –1438 A/G and 5-HTTLPR polymorphisms and personality dimensions in adolescent anorexia nervosa: association study. Neuropsychobiol. 2006; 53:33-9.

Seitz, J., Bühren, K., von Polier, G. G., Heussen, N., Herpertz-Dahlmann, B., Konrad, K. Morphological changes in the brain of acutely ill and weight-recovered patients with anorexia nervosa. Zeitschrift für Kinder-und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie. 2013, 42(1):7-17; quiz 17-8.

Scott-Van Zeeland, A. A., Bloss, C. S., Tewhey, R., Bansal, V., Torkamani, A., Libiger, O., Smith, E. N. Evidence for the role of EP HX2 gene variants in anorexia nervosa. Mol. Psych. 2014; 19(6), 724-732.

Shabalina, S. A., Spiridonov, N. A., Kashina, A. Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity. Nucle.Acid. Res. 2013; 41(4), 2073-2094.

Schooler D, Daniels EA. I am not a skinny toothpick and proud of it': Latina adolescents' ethnic identity and responses to mainstream media images. Body Image 2014; 11:11–18.

Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., Baskin, D. G. Central nervous system control of food intake. Nature. 2000; 404 (6778), 661-671.

Schork N, Murray S, Frazer K, Topol E. Common vs rare allele hypotheses for complex diseases. Curr. Opin. Genet. Dev. 2009; 19(3):212-219.

Seitz, J., Bühren, K., von Polier, G. G., Heussen, N., Herpertz-Dahlmann, B., & Konrad, K. Morphological changes in the brain of acutely ill and weight-recovered patients with anorexia nervosa. Zeitschrift für Kinder-und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie 2013.

Silva-Zolezzi, I., Hidalgo Miranda, A., Estrada Gil, J., Fernández López, J. C., Uribe Figueroa, L., Contreras, A. Análisis de la diversidad genómica en las poblaciones mestizas mexicanas para desarrollar medicina genómica en México. Proc Natl Acad Sci US A, 2009; 106(21), 8611-8616.

Singh S, Yamashita A, Gouaux. Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporter. Nature. 2007; 448:952-956.

Smith K, Fairburn C, Cowen P. Symptomatic relapse in bulimia nervosa following acute tryptophan depletion. Arch Gen Psych. 1999; 56:171-6.

Smith, L. J., Henderson, J. A., Abell, C. W., & Bethea, C. L. Effects of ovarian steroids and raloxifene on proteins that synthesize, transport, and degrade serotonin in the raphe region of macaques. Neuropsychopharmacol. 2004; 29(11), 2035-2045.

Steiger H. Eating disorders and the serotonin connection: state, trait and developmental effects. J. Psych. Neurosc. 2004; 29(1):20-29.

Steiger H, Richardson J, Israel M, Yin NMK, Bruce K. Reduced density of platelet-binding sites for (3H) paroxetine in remitted bulimic women. Neuropsychopharma. 2005; 30:1028-1032.

Steiger H, Richardson R, Schmitz N, Joober R, Israel M, Bruce KR, et al. Association of trait-defined, eating-disorder sub-phenotypes with (biallelic and triallelic) 5-HTTLPR variations. J Psychiatr Res. 2009; 43:1086-94.

Steiger H, Bruce KR, Groleau P. Neural circuits, neurotransmitters, and behavior: serotonin and temperament in bulimic syndromes. Curr Top Behav Neurosci. 2011; 6:125-38.

Stice, E., Marti, C. N., Durant, S. Risk factors for onset of eating disorders: Evidence of multiple risk pathways from an 8-year prospective study. Behav. Res. Theraph. 2011; 49(10), 622-627.

Strober, M., Lampert, C., Morrell, W., Burroughs, J., Jacobs, C. A controlled family study of anorexia nervosa: Evidence of familial aggregation and lack of shared transmission with affective disorders. International J. Eat. Disord. 1990; 9(3), 239-253.

Strober M, Freeman R, Lampert C, Diamond J, Kaye W. Controlled family study of anorexia nervosa and bulimia nervosa: evidence of shared liability and transmission of partial syndromes. Am J Psych. 2000; 157: 393-401.

Sullivan PF, Bulik CM, Fear JL, Pickering A. Outcome of anorexia nervosa: a case-control study. Am J Psych. 1998 Jul; 155(7):939-46.

Sundaramurthy D, Pieri L, Gape H. Analysis of the serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) in anorexia nervosa. Am. J. Med. Gen. 2000; 96:53-55.

Sutcliffe J, Delahanty R, Prasad H, McCauley J, Lan Q, Li C, et al. Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behavior. Am. J. Hum. Genet. 2005; 77:265-279.

Tao-Cheng JH, Zhou FC. Differential polarization of serotonin transporters in axons versus soma-dendrites: an immunogold electron microscopy study. Neurosc. 1999; 94: 821– 830.

Taub, D. R., Page, J. Molecular signatures of natural selection for polymorphic genes of the human dopaminergic and serotonergic systems: A review. Front. Psych. 2016; 7, 857.

Tchanturia K, Marin M.A, Harrison A, Hambrook D. Why study positive emotions in the context of eating disorders? Current Psychiatry Reports. 2015; 17:e537

Tauscher, J., Pirker, W., Willeit, M., de Zwaan, M., Bailer, U., Neumeister, A., Kasper, S. [123I] β-CIT and single photon emission computed tomography reveal reduced brain serotonin transporter availability in bulimia nervosa. Biol. Psych. 2001; 49(4), 326-332.

Thornton, C., Russell, J. Obsessive compulsive comorbidity in the dieting disorders. Int. J. Eat. Disor. 1997; 21(1), 83-87.

Treasure J, Holland A. Genetic vulnerability to eating disorders: Evidence from twin and family studies. In: Remschmidt H, Schmidt MH, editors. Child and Youth Psychiatry: European Perspectives. Lewiston, NY: Hogrefe & Huber; 1990.

Tucker DM, Luu P, Pribram K. Social and emotional self-regulation. Ann NY Acad Sci. 1995; 769:213–39.

Tozzi F, Thornton L, Klump K, Fichter M, and Halmi K, Kaplan A. et al. Symptom fluctuation in eating disorders: correlates of diagnostic crossover. Am. J. Psych. 2005; 162:732-740.

Unikel C, Bojorgez I, VillaToro J, Fleiz C, Mediana-Mora M. Conductas alimentaria de riesgo en población estudiantil del Distrito Federal: tendencias 1997-2003. Rev. Invest. Clin, 2000; 58, 15-27.

Urwin RE, Bennetts BH, Wilcken B, Beumont PJ, Russell JD, Nunn KP. Investigation of epistasis between the serotonin transporter and norepinephrine transporter genes in anorexia nervosa. Neuropsychopharm. 2003; 28:1351–1355

Urwin RE, Patrick KN. Epistatic interaction between the monoamine oxidase A and serotonin transporter genes in anorexia nervosa. Eur J Hum Genet. 2005; 13:370-five.

Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. Nutr Metab Cardiovasc Dis.2008; 18:158–168

Van den Eynde F, Guillaume S, Broadbent H, Stahl D, Campbell IC, et al. Neurocognition in bulimic eating disorders: A systematic review. Acta Psych. Scan. 2011; 124(2):120–140.

Vargas, Leopoldo Ariza, et al. Percepción de la imagen corporal en adolescentes practicantes y no practicantes de gimnasia acrobática. Retos: nuevas tendencias en educación física, deporte y recreación.2021; 39: 16.

Vervaet M, van Heeringen C, Audenaert K. Personality-related characteristics in restricting versus binging and purging eating disordered patients. Compr Psychiatry. 2004 Jan;45(1):37–43.

Vitousek, K. y Manke, F. Personality variables and disorders in anorexia nervosa and bulimia nervosa. J. Abnor. Psych.1994; 103(1), 137.

Waxman S. A systematic review of impulsivity in eating disorders. Eur Eat Disord Rev.2009; 17: 408–425.

Wang, K., Zhang, H., Bloss, C. S., Duvvuri, V., Kaye, W., Schork, N et al. A genome-wide association study on common SNPs and rare CNVs in anorexia nervosa. Mol. Psych. 2011; 16(9), 949-959.

Warren CS, Gleaves DH, Rakhkovskaya LM. Score reliability and factor similarity of the Sociocultural Attitudes Towards Appearance Questionnaire 3 (SATAQ-3) among four ethnic groups. J Eat Disord 2013; 1:14.

Welch S, Fairburn C. Impulsivity or comorbidity in bulimia nervosa. A controlled study of deliberate self-harm, alcohol, and drug misuse in a community sample. Brit. J. Psych.1996; 169(4):451-458.

Watson, H. J., Yilmaz, Z., Thornton, L. M., Hübel, C., Coleman, J. R., Gaspar, H. A., et al. Genome-wide association study identifies eight risk loci and implicates metabo-psychiatric origins for anorexia nervosa. Nat. Genets. 2019; 51(8), 1207-1214.

Wendand J, Martin B, Kruse M, Lesch K, Murphy D. Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4 with reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. Mol. Psych. 2006:1-3.

Werner K, Gross J.J. Emotion regulation and psychopathology: A conceptual framework. En A. M. Kring y D. S. Sloan (Eds.), Emotion regulation and psychopathology: A transdiagnostic approach to etiology and treatment. Nueva York: Guilford Press; 2010. 13-37

Wildes, J. E., & Marcus, M. D. Incorporating dimensions into the classification of eating disorders: three models and their implications for research and clinical practice. International J. Eat. Disord. 2013; 46(5), 396-403.

Wonderlich S, Crosby R, Joiner T, Peterson C, Bardone A, Klein M. et al. Personality subtyping and bulimia nervosa: psychopathological and genetic correlates. Psych. Med. 2005; 35:649-657.

Wonderlich, S. A., Joiner Jr, T. E., Keel, P. K., Williamson, D. A., Crosby, R. D. Eating disorder diagnoses: empirical approaches to classification. Am. Psych. 2007; 62(3), 167.

Wray, N., R., Visscher, P. Estimating trait heritability. Nature Education. 2018, 1(1), 161.

Yamashita A, Singh S, Kawate T, Jin Y, Gouaux E. Crystal structure of a bacterial homologue of Na+/Cl- dependent neurotransmitter transporter. Nature. 2005; 437:215-223.

Yates C, Sternberg M. The effects of non-synonymous single nucleotide polymorphism (nsSNPs) on protein-protein interaction. J. Mol. Biol. 2013; 425(21):3949-3963.

Yilmaz Z, Halvorsen M, Bryois J, Yu D, Thornton LM, Zerwas S, Micali N, Moessner R, Burton CL, Zai G, Erdman L. Examination of the shared genetic basis of anorexia nervosa and obsessive–compulsive disorder. Mol. Psych. 2018 Aug 7:1-1.

Yokokura M, Terada T, Bunai T, Nakaizumi K, Kato Y, Yoshikawa E, et al. Alterations in serotonin transporter and body image-related cognition in anorexia nervosa. Neuro-image Clin. 2019 Jan 1; 23:101928.

Zouk H, Tousignant M, Seguin M, Lesage A, Turecki G. Characterization of impulsivity in suicide completers: clinical, behavioral and psychosocial dimensions. J. Affect.Disord. 2006; 92(2), 195-204.

Zhou Z, Zhen J, Karpowich N, Law C, Reith M, Wang D. Antidepressant specificity of serotonin transporter suggested by three LeuT SSRI structure. Nat. Struct. Mol. Biol. 2009; 16:652-657.

14. ANEXOS (ARTICULO)

Gene 748 (2020) 144675

Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Short communication

Sequence analysis of five exons of *SLC6A4* gene in Mexican patients with anorexia nervosa and bulimia nervosa

S. Hernández-Muñoz[a,b], B. Camarena-Medellin[b,*], L. González-Macías[c], A. Aguilar-García[b], G. Flores-Flores[d], D. Luna Dominguez[e], A. Azaola-Espinosa[c], M. Flores-Ramos[f], A. Caballero-Romo[c]

[a] Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud – Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calz. Del Hueso 100, Col. Villa Quietud, Mexico City 04960, Mexico
[b] Departamento de Farmacogenética, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calz. México Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Mexico City 14370, Mexico
[c] Clínica de Trastornos Alimentarios, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calz. México Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Mexico City 14370, Mexico
[d] Hospital y Atención Psiquiátrica Continua, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calz. México Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Mexico City 14370, Mexico
[e] Laboratorio Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Villa Quietud, Mexico City 04960, Mexico
[f] Directora de Enseñanza, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calz. México Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Mexico City 14370, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Anorexia Nervosa
Bulimia Nervosa
Serotonin transporter
Sequencing
SLC6A4
Exons
Genetic variants

ABSTRACT

Background: Accumulating evidence indicates that alterations in the serotonin system are related to changes in eating behavior. The serotonin transporter is encoded by the *SLC6A4* gene and has been an interesting candidate for anorexia nervosa- restrictive type (AN-R) and bulimia nervosa (BN). Interestingly, functional variants have been identified in the coding region that could contribute to understand the role of this gene in eating disorders. The aim was to identify genetic variants in five exons of *SLC6A4* gene using Sanger-sequencing in anorexia nervosa-restrictive and bulimia nervosa patients, and a control group.
Method: The sample consisted of 86 patients and 50 control subjects. We obtained DNA samples from all subjects and performed Sanger-sequence analysis of the 1, 2, 3, 8 and 9 exons. The sequences were compared with the reference sequence of the *SLC6A4* gene.
Results: The sequence analysis of the five exons of the gene identified several variants. In the AN-R, we observed two novel variants (g.130delA and c.1740G > A), three synonymous variants (rs57172732, rs55908624, rs74478645) and a missense variant (L90F) reporting a probably deleterious and damaging variant.
In BN, we identified two novel variants (g.295C > G and c.1725G > A), and the non-synonymous (rs28914832/I425V), reported as benign. Interestingly, we observed the 425V variant in three patients in the BN, variant that previously was reported in patients with a spectrum obsessive–compulsive disorder.
Conclusion: The results of our study suggest that variants of the *SLC6A4* gene are related with a possible damaging or gain-of-function and may be involved in the susceptibility to AN-R and BN patients. However, the present findings should be considered as preliminary until replicated in large samples.

1. Introduction

Anorexia nervosa (AN) and bulimia nervosa (BN) are mental disorders characterized by severe disturbance of body image and meal patterns (DSM-5). AN is defined by an intense fear of gaining weight, or persistent behavior that interferes with weight gain, even though underweight. AN restrictive (AN-R) type is defined by severe restrictions on the amount and type of food they consume, obsessive rules and rigid thinking related with gain weight. BN is an eating disorder characterized by binge eating followed by inappropriate compensatory behaviors to prevent weight gain (DSM-5). The etiology is unknown, but the genetic influences contribute in the onset and development of the

* Corresponding author.
E-mail addresses: camare@imp.edu.mx (B. Camarena-Medellin), macias@imp.edu.mx (L. González-Macías), Aguilar199@imp.edu.mx (A. Aguilar-García), azaola@correo.xoc.uam.mx (A. Azaola-Espinosa), monica.flores@imp.edu.mx (M. Flores-Ramos).

https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144675
Received 20 November 2019; Received in revised form 4 March 2020; Accepted 14 April 2020
Available online 18 April 2020
03/8-1119/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Nomenclature

ED	Eating disorders
AN-R	Anorexia nervosa restrictive
BN	Bulimia nervosa
5-HTT	serotonin transporter
PKC	Protein kinase
PKG	Protein kinase G
MAPK	p38 mitogen- activated protein kinase
WES	Whole exome sequencing
GWAS	Genome-wide association study
HDAC4	*Histone deacetylase 4*
ESRRA	*Estrogen related receptor alpha*
SLC6A4	*Gen transporter of serotonin*
BDNF	brain derived neurotrophic factor
DRD4	*dopamine receptor D4*
CCKR	*Pyamide receptor*
NMS	*Neuromedin S*
SERT	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4
SCID	Structured Clinical Interview for Mental Disorders
YBC-EDS	Yale Brown-Cornell Eating Disorders Scale
ExoSAP-IT	Shrimp Alkaline Phosphatase

disease (Thornton et al., 2010).

Evidence supports altered serotoninergic neurotransmission in the physiology of AN and BN. Studies in animal models and humans indicate that alterations of the serotonin system result in changes in emotional states and altered satiety signaling in the brain.

The serotonin transporter (5-HTT) is a protein key in the serotoninergic system it is on the pre-synaptic membranes of nerve terminals in the midbrain and in the brain stem raphe nuclei. The synaptic activity of 5-HTT mediates rapid removal and recycling of released serotonin following neuronal stimulation in the brain and terminates the action of serotonin, playing a role in mediating the regulation of the availability of serotonin to other receptors of serotonergic systems. Additionally, the 5-HTT is regulated by protein kinase-associated pathways, including protein kinase C (PKC), protein kinase G (PKG), and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). The PKC-dependent phosphorylation and down-regulation of the 5-HTT protein is sensitive to extracellular serotonin, which plays a regulatory role in the transporter of 5-HT (Murphy et al., 2008).

The 5-HTT is encoded by the *SLC6A4* gene located on chromosome 17q11.1-q12 and is composed of 14 exons, spanning 40 kb. The sequences of the transcript codified a protein comprising 630 amino acid and has twelve transmembrane domains. Common variants, minor allele frequency (MAF) ≥ 5%, low-frequency variants (0.5 ≥ MAF < 5%), and rare variants (MAF < 0.5%) have been identified in Mexican-American population (Glatt et al., 2001).

AN- are highly heritable suggesting that genetic variations play an important role in the pathogenesis (Bulik et al., 2006). The whole exome sequencing (WES) studies have identified variants that may have a major contribution in the development to diseases. Previously, one study analyzed two large families with multiple members with AN, identifying two rare variants, rs200039730 and rs61754648 in *HDAC4* and *ESRRA* genes respectively, increasing the risk of the developed eating disorders (Cui et al., 2013). In addition, an excessive burden of novel damaging variants was identified in 186 genes in restricted-eating group and in 245 genes in the binge-eating group, with an implication of the genes involved in neuropeptide/neurotrophic pathways implicated in appetite regulation, including the neurotensin-glucagon-like peptide-1 and *BDNF* signaling (Lutter et al., 2017). More recently, were identified missense variants in the *DRD4*, *CCKR*, *NMS* genes that are highly expressed in the hypothalamus system, and co-segregate with AN (Bienvenu et al., 2019).

Genetic studies of *SLC6A4* polymorphisms reported in Mexican patients an association between S/Lg alleles and BN (Camarena et al., 2018). An association was reported between BN and variable number tandem repeat polymorphism VNTR located in intron 2. Other research found differences between subtypes of anorexia nervosa and the SNPs rs1872924 and rs3794809, located in introns 2 and 3 (Kiezebrink et al., 2010). Similarly, a study in multiple families with eating pathology analyzed SNPs located in introns 2, 3, 4, and a 3untranslated region, but no significant associations were found between any genetic variant and ED-related phenotypes such as binge eating and weight/shape concern (Munn-Chernoff et al., 2012). We analyzed the G56A variant (rs6355) that presents amino acid changes and affects the transportation function and regulation, reporting an over-transmission of the 56A allele in families with AN (Camarena et al., 2012). Finally, other study identified functional variants in the exons 8 and 9, which were associated with obsessive-compulsive behaviors and anorexia nervosa (Ozaki et al., 2003). Interesting, this trait has been observed in AN-R patients, suggesting a common etiology (Anttila et al., 2018).

The variants identified in exons can have a structural and functional impact in the gene causing a gain or loss of function of the protein. Also, p.G56A, p.L605A, and p.I425V polymorphisms revealed high levels of basal 5-HT transporter in transfected and natively expressing cells (Prasad et al., 2008). Additionally, it was reported that p.G56A and p.L605A showed an altered pattern of regulation by multiple Ser/Thr kinases known to regulate SERT in native and transfected cells. Thus, both variants demonstrate insensitivity to activators of protein kinase G (PKG) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), stimuli that normally trigger elevated surface expression or enhancement of SERT catalytic rates (Blakely et al., 2005). It is interesting to identify other genetic variants in eating disorders; therefore, the aim of the study was to perform the sequencing of five exons of *SLC6A4* in AN-R and BN patients.

2. Methods

2.1. Subjects

The participants were recruited from the Clinic of Eating Disorders at the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente Muñiz. The local Institutional Ethics Committee approved the study. All participants and healthy controls gave written informed consent for participation at the time of recruitment.

The total sample included 86 female patients, 36 with anorexia nervosa-restrictive type (AN-R) and 50 with bulimia nervosa (BN) according to DSM-5 criteria.

Exclusion criteria included psychotic symptoms and significant medical and/or neurological illness.

The control group comprised 50 healthy females without current or past psychiatric history, screened using the Spanish version of the Diagnostic Interview Schedule (DIS). All individuals were over the age or risk for ED. All participants were Mexican Mestizos with a family background of three generations born in Mexico. All the participants provided written informed consent by the Ethics Committee of the Institute.

2.2. Assessment

Patients were evaluated and diagnosed according to DSM-5 (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition*) criteria for ED using the Structured Clinical Interview for Mental Disorders v2.0 (SCID-1) (First et al., 2015). We measured the presence of impulsivity

using the Plutchik's impulsivity scale, Spanish version (Páez et al., 1996), the severity of preoccupations and rituals using the Spanish-language version of the Yale Brown-Cornell Eating Disorders Scale (YBC-EDS) (Caballero et al., 2003), and the evaluation of behavior and psychological traits in eating disorders using the Eating Disorder Inventory EDI-2 (García-García et al., 2003).

2.3. DNA isolation and exon sequencing

Genomic DNA was extracted from whole blood using the Wizard Genomic DNA Purification Kit. Five primer pairs were used to amplify the exons 1, 2, 3, 8, and 9 (Kraft et al., 2005). The amplification was performed in a final volume of 25 µl containing 100 ng genomic DNA template, 5% DMSO, 1X KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kappa Biosystems), and 0.50 µM of each primer. PCR conditions were 96 °C for 3 min, followed by 25 cycles at 96 °C for 15 sec at 60 °C for 15 sec (exception exon 9, which was 65 °C) and finally 72 °C for 30 sec. After amplification, the samples were visualized in 1.5% agarose Metaphor and 1.5% agarose gel and the size of the PCR product was confirmed using a 50 and 1000 bp DNA ladder. The remaining PCR product was cleaned up using enzyme Exonuclease 1 and Shrimp Alkaline Phosphatase (ExoSAP-IT).

The sequencing of amplicons was carried out using Big DyeTM chemistry (BigDye Terminator, Version 3.1; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR products of the samples were sent to Genewiz Global Headquarter South Plainfield, NJ., USA (https://www.genewiz.com), for Sanger sequencing with a 373xL DNA Analyzer. The DNA sequence was analyzed using the Bioedit software version 7.2.5. Each sequence was subjected to an individual BLAST search to verify its identity to the GenBank mRNA sequence NM_001045.5.

2.4. In silico analysis

To evaluate the effect of the coding variants in protein, we used two software, the SIFT (http://sift.jcvi.org), which is a sequence homology-based tool that predicts the deleterious and tolerant and the Polyphen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), which is a sequence and structure evolutionary conservation-based tool to classify damaging effect of amino acid substitutions and estimates position specific independent count score demonstrating 0–1 probably damaging index.

3. Results

3.1. Clinical characteristics

The sample included 36 patients with AN-R, 50 with BN and 50 control subjects. The patients included in the study did not experience a diagnostic transition between eating disorders.

In terms of clinical characteristics of the sample, we observed differences in the age, (F = 114.4, P = 0.00), and BMI (F = 70.4, P = 0.00) between AN-R, BN and control group. Also, we observed less impulsivity in the AN-R (mean 15.63 SD 8.11) than BN (mean 27.36 SD 6.72). Also, the severity of the preoccupations and rituals was minor score in AN-R (mean 15.87 SD 8.72) and major in BN (mean 21.21 SD 4.30) (Table 1).

In the sample, 47 patients (55%) had a comorbidity, 5 (14%) and 13 (26%) had anxiety disorders; 12 (33%) and 19 (38%) had major depressive disorder, in AN-R and BN patients, respectively.

3.2. Genetic variants

3.2.1. Anorexia nervosa-restrictive type

In the analysis of the five exons of the gene, there were alignment of the sequences of the patients and the control group (Table 2). Among the discovered variants in the patients, two were novel variants, g.130delA and c.1740G > A, located in exons 1 and 8 respectively, and they have not been reported yet in public databases (gnomAD, dbSNP, 1000 Genomes). In addition, we detected variants to the gnomAD database, three synonymous variants, rs57172732, rs55908624, and rs74478645 located in the exons 3 and 8, and could not affect the amino acid. Finally, we observed one missense variant, rs1183088111, in the exon 2, this variant c.268T > A causes the amino acid change from leucine to phenylalanine (L90F); the change did not affect the length of the protein, but in the analysis of prediction of protein, the change of amino acid was reported as probably deleterious and damaging (SIFT score = 0.01; Polyphen score = 1). In total, 3/36 individuals in our restricted eating group were heterozygous for the L90F variant of the gen (Fig. 1a, b).

3.2.2. Bulimia nervosa

In the analysis of sequencing, there were alignment of the sequences of the patients and control group (Table 3). Among the discovered variants, two novel variants, g.295C > G and c.1725G > A located in the exons 1 and 8 respectively, and not been reported yet in public databases, and we observed one missense variant, rs28914832, found in exon 9; transversion changes of the variant (A > T) cause the amino acid change from isoleucine to valine in position 425. However, the change did not affect the length of the protein; in the analysis of prediction of protein, the change of amino acid was reported as tolerant and benign (SIFT score = 0.63; PolyPhen score = 0.06). The potential impact of this variant was also interpreted according to current standards and guidelines, which suggested that the variant is pathogenic (Richards et al., 2015). Additionally, we observed that 3/50 patients were homozygous 425 V (Fig. 1c, d).

Finally, we observed variants shared among AN-R, BN and control groups, for a total of five variants: one novel variant g.136delC, located in the exon 1, two missenses, rs202152288 and rs140436169, identified in exon 2, and two frameshift insertions, rs769651028 and rs34542731, in exons 2 and 3 (Tables 2 and 3).

4. Discussion

Previous studies have identified genetic variants of the *SLC6A4* gene, which are associated with ED (Calati et al., 2011; Camarena et al., 2018). In the present study, we reported the findings of Sanger sequencing in individuals with AN-R, BN and a control group. We identified a higher number of variants in exons 1, 2, and 8, and a lower number in exons 3 and 9, those coding highly conserved regions in the *SLC6A4*. In general, we reported functional variants, as frameshifts insertion (p.T47fs and p.V394fs) that could be introduced an early stop codon of the protein, and functional variants (p.V50L, p.L90F, p.G41A, and I425V) that together could have an effect on the protein

Table 1
Clinical characteristics of the sample with females of AN-R and BN

	AN-R (n = 36)		BN (n = 50)		Controls (n = 50)	
	Mean	*SD*	*Mean*	*SD*	*Mean*	*SD*
Age (years)	18.08	3.89	20.0	4.30	40	11.6
BMI (kg/m^2)	15.66	1.51	24.61	4.41	22	3.4
Age of onset (years)	14.40	2.50	13.48	2.84		
Duration of disease (years)	4.03	4.44	7.30	4.74		
Plutchik's scale	15.63	8.11	27.36	6.72		
YBC-EDs scale	15.87	8.72	21.21	4.30		
EDI-2:						
Drive for thinness	10.35	7.92	16.90	5.48		
Bulimia	1.85	5.58	10.14	5.91		
Body dissatisfaction	10.55	4.98	16.48	5.28		
Interoceptive awareness	8.85	9.32	15.94	7.97		
EDI Total score	62.53	41.39	93.78	34.49		

SD: Standard deviation. YBC-EDs: Scale Yale-Brown of Cornell Eating Disorders. EDI-2: Eating Disorders Inventory.

Table 2
Variants of *SLC6A4* identified in *restrictive-eating*.

Gene region	References dbSNP	Nucleotide change	Amino acid	Prediction		No. of subjects	
				SIFT	PolyPhen	AN-R (n = 36)	Controls (n = 50)
Exon 1	New	g.130delA	–	–	–	0.03	0
Exon 1	New	g.136delC	–	–	–	1	1
Exon 2	rs769651028	c.139_140insAC	p.T47fs	–	–	1	1
Exon 2	rs202152288	c.148G > C	p.V50L	Tolerant	Benign	1	1
Exon 2	rs1183088111	c.268T > A	p.L90F	Deleterious	Damaging	0.04	0
Exon 2	rs140436169	c.121C > T	p.G41A	Deleterious	Damaging	1	1
Exon 3	rs34542731	c.1179dupA	p.V394fs	–	–	1	1
Exon 3	rs57172732	c.411G > A	p.L137	–	–	0.01	0
Exon 8	rs55908624	c.1149C > T	p.L383	–	–	0.01	0
Exon 8	rs74478645	c.1164G > A	p.G388	–	–	0.01	0
Exon 8	New	c.1740G > A	–	–	–	0.01	0

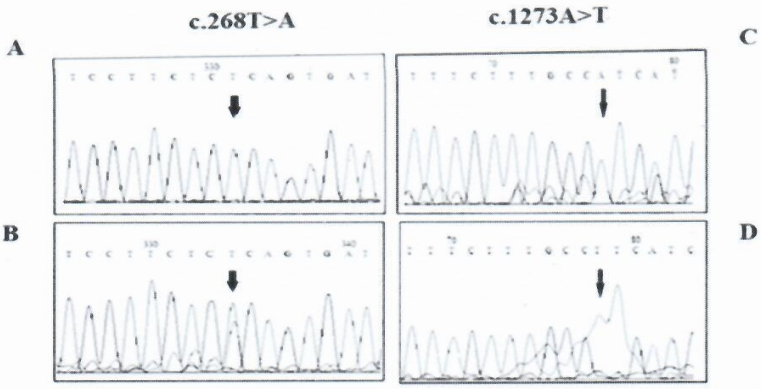

Fig. 1. Sequencing results of the forward strand of the variants in the exons. Arrows denote the variant. The results in the exon 2, (A) Control subjects c.268 T > A; (B) Patients with AN-R were heterozygous. Results in the exon 9. (C) Control subjects c.1273A > T; (D) Patients with BN homozygous.

Table 3
Variants of *SLC6A4* identified in *BN-binge-eating*.

Gene region	References dbSNP	Nucleotide change	Amino acid	Prediction		No. of subjects	
				SIFT	PolyPhen	BN (n = 50)	Controls (n = 50)
Exon 1	New	g.136delC	–	–	–	1	1
Exón 1	New	g.295C > G	–	–	–	0.02	0
Exon 2	rs769651028	c.139_140insAC	p.T47Sfs	–	–	1	1
Exon 2	rs202152288	c.148G > C	p.V50L	Tolerant	Benign	1	1
Exon 2	rs140436169	c.121C > T	p.G41A	Deleterious	Damaging	1	1
Exon 3	rs34542731	c.1179dup A	p.V394fs	–	–	1	1
Exon 8	New	c.1725G > A	–	–	–	0.01	0
Exon 9	rs28914832	c.1273A > T	p.I425V	Tolerant	Benign	0.03	0

transporter, as confer a gain of function of the protein or a poor affinity to the 5-HT (Murphy et al., 2008). In particular, we identified three patients in the AN-R group heterozygous for p.L90F, located in the exon 2, a change of amino acid that could modulate the exonic splicing enhancer or silencer after bioinformatics prediction. Interestingly, we previously reported a variant p.G56A in the same exon in a AN-R, which has been reported as a gain-of-function variant; therefore, it is possible that two variants could have a critical role in the serotonin transporter activity in the brain (Prasad et al., 2008). Despite the limitation of GWAS findings for serotonin risk-conferring genes in AN-restrictive type, different studies have identified functional variants in the serotonin transporter with a major role in anorexia nervosa (Kiezebrink et al., 2010; Camarena et al., 2012; Solmi et al., 2016). WES reports identified functional variants in genes that are expressed in the lateral parabrachial and ventral tegmental areas of the hypothalamus, which plays a key role in the regulation of appetite; therefore, some functional variants identified in *SLC6A4* could confer biological vulnerability to develop an eating behavior as for example, the identification of damaging variants in patients with anorexia nervosa restrictive (Negraes et al., 2017; Lutter et al., 2017).

Interestingly, the present study reported a minor number of variants in the BN group compared with control subjects. We identified three

patients homozygous for 425 V, a functional variant that was previously associated with the spectrum rigid-compulsive behaviors (Delorme et al., 2005). A family association study reported an over-transmission of the 425 V variant in patients with anorexia nervosa and OCD with perfectionist and compulsive behaviors related with food and exercise. These observations might indicate that several disorders partially overlap in clinical comorbidity and in causality, including genetic transmission of the p.I425V that may operate as an aggravating factor for the severity of these disorders (Ozaki et al., 2003). Also, WES study identified a functional variant in the *ESRRA* and *HDAC4* genes in families with multiple persons affected with anorexia and bulimia nervosa with a high comorbidity with OCD and perfectionism personality trait (Cui et al., 2013).

We observed comorbidity with anxiety disorder and major depression disorder according with previous studies (Kaye et al., 2004; Stice et al., 2004). Interestingly, *SLC6A4* gene reported association with bulimia nervosa and comorbid psychopathology (Richardson et al., 2008; Steiger et al., 2008); therefore, gene variants of *SLC6A4* could have a pleiotropic effect in AN-R, BN and phenotypes that co-occur with eating disorders such as anxiety disorder and major depressive disorder.

It has been suggested that functional variants have been over-represented in the brain and predispose to the spectrum of complex serotonergic phenotypes and can be related to serotonin dysfunction (Anttila et al., 2018). The expectation that syndromes with a restrictive form should be characterized by an exaggeration of dysphoric mood relational with increased serotoninergic tone, whereas syndromes characterized by binge-purge type would correspond to increased impulsivity, disinhibition of eating behavior, and other features associated with low serotonergic tone (Steiger, 2004).

The present study has several limitations. First, the small sample size in our analysis resulted in limited power to identify rare variants; second, we only sequenced five exons of the gene, it could be interesting to explore the complete sequence of *SLC6A4*; and third, we did not include other eating disorder subtypes, which may miss some valuable findings about the role of *SLC6A4* in the eating disorders.

5. Conclusions

The results of our study suggest that variants of the *SLC6A4* gene are related with a possible damaging or gain-of-function and may be involved in the susceptibility in AN-R and BN patients.

Author contributions

SH designed the study and wrote the manuscript. BC, MF, and A-Azaola helped in the preparation and editing of the manuscript. A-Aguilar helped in the standardization of the experiments. AC, LG, GF, and DL carried out the clinical evaluation of the patients. All authors read and approved the final version.

Ethical approval

All procedures performed in this study were in accordance with the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz and with the Helsinki Declaration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was supported by Pfizer Scientific Institute Grant 2006, Mexico City; CONACYT Grant 52272; and ICyTDF Grant DGC-279-2008. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. SH was supported by CONACYT Scholarship (no. 391032). We thank the families and patients who participated in this study.

References

Anttila, V., Bulik-Sullivan, B., Finucane, H.K., Walters, R.K., Bras, J., Duncan, L., 2018. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. Science 360 (6395), p.eaap8757. https://doi.org/10.1126/science.aap8757.

Bienvenu, T., Lebrun, N., Clarke, J., Duriez, P., Gorwood, P., Ramoz, N., 2019. Exome sequencing in a familial form of anorexia nervosa supports multigenic etiology. J. Neu. Trans. 1–7. https://doi.org/10.1007/s00702-019-02056-2.

Blakely, R.D., DeFelice, L.J., Galli, A., 2005. Biogenic amine neurotransmitter transporters: just when you thought you knew them. Physiology, 20(4), 225–231. DOI:10.1152/physiol.00013.2005.

Bulik, C.M., Sullivan, P.F., Tozzi, F., Furberg, H., Lichtenstein, P., Pedersen, N.L., 2006. Prevalence, heritability, and prospective risk factors for anorexia nervosa. Arch. Gen. Psychiatry 63 (3), 305–312. https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.3.305.

Caballero, A.R., Sunday, S.R., Halmi, K.A., 2003. A comparison of cognitive and behavioral symptoms between Mexican and American eating disorder patients. Int. J. Eat. Disord. 34 (1), 136–141. https://doi.org/10.1002/eat.10156.

Calati, R., De Ronchi, D., Bellini, M., Serretti, A., 2011. The 5-HTTLPR polymorphism and eating disorders: a meta-analysis. Int. J. Eat. Disord. 44, 191–199. https://doi.org/10.1002/eat.20811.

Camarena, B., González, L., Hernández, S., Caballero, A., 2012. *SLC6A4* rare variant associated with eating disorders in Mexican patients. J. Psych. Res. 8 (46), 1106–1107. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.04.011.

Camarena, B., Hernandez, S., Gonzalez, L., Flores, G., Luna, D., Aguilar, A., et al., 2018. Association study between the triallelic polymorphism of SLC6A4 gene and eating disorders. Am. J. Psych. Neurosc. 6 (4), 104.

Cui, H., Moore, J., Ashimi, S.S., Mason, B.L., Drawbridge, J.N., Han, S., et al., 2013. Eating disorder predisposition is associated with ESRRA and HDAC4 mutations. J. Clin. Invest., 123(11). DOI:10.1172/JCI71400.

Delorme, R., Betancur, C., Wagner, M., Krebs, M.O., Gorwood, P., Pearl, P., et al., 2005. Support for the association between the rare functional variant I425V of the serotonin transporter gene and susceptibility to obsessive compulsive disorder. Mol. Psychiatry 10 (12), 1059–1061. DOI:10.1038/sj.mp.4001728.

First, M.B., Williams, J.B.W., Karg, R.S., Spitzer, R.L., 2015. Structured clinical interview for DSM-5 (SCID-5 for DSM-5). American Psychiatric Association, Arlington, VA.

García-García, E., Vázquez-Velázquez, V., López-Alvarenga, J.C., Arcila-Martínez, D., 2003. Internal validity and diagnostic utility of the eating disorder inventory, in Mexican women. Salud Pública de Mexico 45 (3), 206–210 PMID: 12870422.

Glatt, C.E., DeYoung, J.A., Delgado, S., Service, S.K., Giacomini, K.M., Edwards, R.H., et al., 2001. Screening a large reference sample to identify very low frequency sequence variants: comparisons between two genes. Nat. Gen, 27 (4), 435. DOI:10.1038/86948.

Kaye, W.H., Bulik, C.M., Thornton, L., Barbarich, N., Masters, K., 2004. Price Foundation Collaborative Group. Comorbidity of anxiety disorders with anorexia and bulimia nervosa. Am. J. Psychiatry 161 (12), 2215–2221. DOI:10.1176/appi.ajp.161.12.2215.

Kiezebrink, K., Mann, E.T., Bujac, S.R., Stubbins, M.J., Campbell, D.A. Blundell, J.E., 2010. Evidence of complex involvement of serotonergic genes with restrictive and binge purge subtypes of anorexia nervosa. World J. Biol. Psych. 11 (6), 824–833. DOI:10.3109/15622975.2010.484550.

Kraft, J.B., Slager, S.L., McGrath, P.J., Hamilton, S.P., 2005. Sequence analysis of the serotonin transporter and associations with antidepressant response. Biol. Psychiatry 58 (5), 374–381. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.04.048.

Lutter, M., Bahl, E., Hannah, C., Hofammann, D., Acevedo, S., Cui, H., et al., 2017. Novel and ultra rare damaging variants in neuropeptide signaling are associated with disordered eating behaviors. PloS one 12 (8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181556. e0181556.

Munn-Chernoff, M.A., McQueen, M.B., Stetler, G.L., Haberstick, B.C., Rhee, S.H., Sobik, L.E., et al., 2012. Examining associations between disordered eating and serotonin transporter gene polymorphisms. Int. J. Eat Disord. 45 (4), 556–561. https://doi.org/10.1002/eat.22001.

Murphy, D.L., Fox, M.A., Timpano, K.R., Moya, P.R., Ren-Patterson, R., Andrews, A.M., et al., 2008. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. Neuropharma 55 (6), 932–960. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.08.034.

Negraes, P.D., Cugola, F.R., Herai, C.A., Trujillo, A.S., Cristino, T., Chailangkarn, A.R., 2017. Modeling anorexia nervosa: transcriptional insights from human iPSC-derived neurons. Transl. Psychiatry 7 (3), e1060. https://doi.org/10.1038/tp.2017.37.

Ozaki, N., Goldman, D., Kaye, W.H., Plotnicov, K., Greenberg, B.D., Lappalainen, J., et al. 2003. Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype. Molecular Psychiatry 8 (11), 933. DOI:10.1038/sj.mp.4001365.

Páez, F., Jiménez, A., López, A., Ariza, J.P.R., Soto, H.O. Nicolini, H., 1996. Estudio de validez de la traducción al castellano de la Escala de Impulsividad de Plutchik. Salud Mental 19 (Supl 3), 10–12.

Prasad, H.C., Steiner, J.A., Sutcliffe, J.S. and Blakely, R.D., 2008. Enhanced activity of human serotonin transporter variants associated with autism. Phil. Transc. Royal Soc. B: Biol. Sci. 364 (1514), 163–173. DOI:10.1098/rstb.2008.0143.

Richardson, J., Steiger, H., Schmitz, N., Joober, R., Bruce, K.R., Israel, M., et al., 2008. Relevance of the 5-HTTLPR polymorphism and childhood abuse to increased psychiatric comorbidity in women with bulimia-spectrum disorders. J. Clin. Psychiatry 69, 981–990. https://doi.org/10.4088/jcp.v69n0615.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., et al., 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med 17 (5), 405–424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30.

Solmi, M., Gallicchio, D., Collantoni, E., Correll, C.U., Clementi, M., Pinato, C., et al., 2016. Serotonin transporter gene polymorphism in eating disorders: data from a new biobank and META analysis of previous studies. World. J. Biol. Psych. 17 (4), 244–257. https://doi.org/10.3109/15622975.2015.1126675.

Steiger, H., Joober, R., Gauvin, L., Bruce, K.R., Richardson, J., Israel, M., et al., 2008. Serotonin-system polymorphisms (5-HTTLPR and -1438G/A) and responses of patients with bulimic syndromes to multimodal treatments. J. Clin. Psychiatry. 69, 1565–1571. https://doi.org/10.4088/jcp.v69n1006.

Steiger, H., 2004. Eating disorders and the serotonin connection: state, trait and developmental effects. J. Psychiatry Neurosci. 29 (1), 20. PMCID:PMC305267.

Stice, E., Burton, E.M., Shaw, H., 2004. Prospective relations between bulimic pathology, depression, and substance abuse: unpacking comorbidity in adolescent girls. J. Consulting Clin. Psychol. 72 (1), 62. DOI: 10.1037/0022-006X.72.1.62.

Thornton, L.M., Mazzeo, S.E., Bulik, C.M., 2010. The heritability of eating disorders: methods and current findings. In: Beh. Neurobiol. Eating Disorders. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 141–156. https://doi.org/10.1007/7854_2010_91.