



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

Reporte de Servicio Social

**ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS EN RECEPTORES
DE NEUROTRANSMISORES EN EL TRASTORNO
DEPRESIVO MAYOR EN POBLACIÓN MESTIZA
MEXICANA**

José de Jesús Rodríguez Chávez

Matrícula: 2183029229

Fecha: 25 de julio de 2024

Vo. Bo.

Dra. Marisol López López

7808

Departamento de Sistemas Biológicos

UAM Xochimilco

Dra. Nancy Monroy Jaramillo

09136591

Departamento de Genética

INNNMVS

Contenido

I.	Datos generales	3
II.	Introducción.....	4
III.	Justificación.....	5
IV.	Marco teórico.....	6
	A) Gen <i>HTR1A</i>	6
	B) Gen <i>HTR2A</i>	6
	C) Gen <i>HTR6</i>	7
	D) Gen <i>DRD2</i>	7
	E) Gen <i>DRD3</i>	8
	F) PCR-RFLP	8
V.	Objetivos	9
	A) Objetivo General	9
	B) Objetivos Específicos.....	9
VI.	Metodología.....	9
	A) Selección de las muestras	9
	B) Análisis cuantitativo y cualitativo del DNA genómico.....	10
	C) Genotipificación por PCR-RFLP.....	10
	1) Obtención de los amplicones	10
	2) Resolución de amplicones y RFLP, mediante electroforesis en geles de agarosa	13
	3) Selección de las enzimas de restricción	13
	4) Digestión de los amplicones.....	16
	5) Interpretación teórica de resultados	17
	D) Análisis estadístico	20
	1) Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	20
	2) Comparación de frecuencias.....	20
VII.	Resultados.....	21
	A) Descripción de la muestra.....	21
	B) Genotipificación de la variante <i>HTR1A_rs6295</i>	22
	1) Controles	22
	2) Pacientes	23
	C) Genotipificación de la variante <i>HTR2A_rs6311</i>	23

1) Controles	24
2) Pacientes	24
D) Genotipificación de la variante <i>HTR2A_rs6313</i>	24
1) Controles	25
2) Pacientes	25
E) Genotipificación de la variante <i>HTR2A_rs6314</i>	26
1) Controles	26
2) Pacientes	27
F) Genotipificación de la variante <i>HTR6_rs1805054</i>	27
1) Controles	27
2) Pacientes	28
G) Genotipificación de la variante <i>DRD2_rs1801028</i>	28
1) Controles	29
2) Pacientes	29
H) Genotipificación de la variante <i>DRD2_rs1800497</i>	30
1) Controles	30
2) Pacientes	30
I) Genotipificación de la variante <i>DRD3_rs6280</i>	31
1) Controles	31
2) Pacientes	32
J) Clasificación de la respuesta en pacientes según la escala de Hamilton.....	32
K) Análisis de resultados.....	36
1) Comparación entre pacientes y controles	36
2) Comparación de controles con otras poblaciones.....	37
3) Comparación de pacientes según la respuesta al tratamiento farmacológico.....	40
L) Conclusiones.....	43
VIII. Referencias bibliográficas.....	43

I. Datos generales

Título

Análisis de variantes genéticas en receptores de neurotransmisores en el Trastorno Depresivo Mayor en población mestiza mexicana

Lugar de realización

Laboratorio de Genética Molecular N-103, UAM-Xochimilco y Departamento de Genética, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNNMVS).

Período de realización

Del 24 de junio de 2023 al 25 de diciembre de 2023

Lugar de procedencia

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura

Química Farmacéutica Biológica

Asesores

Asesor interno: Dra. Marisol López López

Asesor externo: Dra. Nancy Monroy Jaramillo

II. Introducción

La depresión es un trastorno del estado de ánimo que se caracteriza por la presencia de cuadros de tristeza, los cuales pueden interferir con el día a día de las personas¹. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud [OMS] se estima que para 2030 será la causa principal de morbilidad a nivel mundial². Algunos de los principales síntomas que caracterizan a la depresión, además del sentimiento de tristeza, son la melancolía, bajo estado de ánimo, sentirse infeliz, pérdida del placer o interés, alteraciones del apetito, sueño y pensamientos suicidas³.

Clínicamente, la depresión tiene diversas clasificaciones, una de ellas es el trastorno depresivo mayor (TDM), el cual se define, según el Manual de Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales 5 (DSM-5) cuando se presentan al menos cinco de los siguientes síntomas simultáneamente por al menos dos semanas, siendo los primeros dos necesarios para el diagnóstico⁴:

- Estado de ánimo deprimido recurrente o irritable en el caso de niños y adolescentes.
- Disminución del interés o placer por la mayoría de las actividades.
- Pérdida o ganancia de peso, o alteraciones del apetito.
- Alteraciones del sueño.
- Agitación o retraso psicomotor.
- Fatiga.
- Sentirse inútil o culpable.
- Disminución del razonamiento, concentración y capacidad de toma de decisiones.
- Pensamientos recurrentes de muerte, ideas suicidas.

El diagnóstico del TDM se hace con distintas escalas de cuestionarios, de los cuales la Escala de Depresión de Hamilton de diecisiete preguntas (HDRS-17) es la más utilizada. Las preguntas del HDRS tienen distintos puntajes; donde, un puntaje final ≤ 7 se considera dentro del rango normal (remisión de los síntomas) y un puntaje ≥ 20 es un indicador de severidad moderada y requiere de un tratamiento médico⁵. Para los valores intermedios con puntajes entre 7-20 existen diversas interpretaciones. Esta escala también permite evaluar la respuesta al tratamiento con fármacos antidepresivos, de manera general se usa el porcentaje de mejora como criterio de evaluación y se considera que una disminución del 50% o más corresponde a una buena respuesta farmacológica⁶.

La etiología del TDM es compleja y multifactorial, al respecto existen diversas hipótesis sobre la patogénesis de esta enfermedad. Actualmente se describen seis mecanismos interrelacionados que explican en gran parte su etiología:⁷

- Disfunción del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal (HHS).
- Desregulación del sistema monoaminérgico.
- Procesos proinflamatorios.
- Anomalías genéticas y epigenéticas.
- Alteraciones estructurales y funcionales del cerebro.

- Ambiente psicosocial.

La mayoría de las estrategias farmacológicas para tratar el TDM se centran en la teoría de la disregulación en la neurotransmisión⁷, por ello, los antidepresivos más usados son los tricíclicos, inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS), inhibidores de la recaptura de serotonina y norepinefrina, entre otros. Sin embargo, cerca de un tercio de los pacientes no responde satisfactoriamente al tratamiento, y cerca de la mitad de los respondedores presentarán recaídas dentro de los primeros 12 meses de tratamiento⁸. Se ha reportado que algunos de estos fármacos a pesar de tener como principal diana a uno o varios sistemas de neurotransmisores, a largo plazo, son capaces de actuar a otros niveles, como en el eje HHS o a nivel de alteraciones estructurales, vía aumento de la neurogénesis⁸, reforzando así la teoría multifactorial de la enfermedad y abriendo la puerta al desarrollo de nuevas alternativas farmacológicas que aumenten el porcentaje de respuesta en pacientes y disminuyan el riesgo de recaída.

Otra estrategia alternativa frente al problema de la TDM resistente al tratamiento, es la aplicación de la farmacogenómica (FGX), o uso de la información genómica para encontrar el tipo y/o dosis del tratamiento farmacológico adecuado para los pacientes. La FGX ha demostrado aumentar la respuesta terapéutica a nivel personal y, a nivel general, aumentando la proporción de pacientes respondedores⁹.

Considerando que a la fecha no existen estudios farmacogenómicos en población mexicana sobre el efecto de farmacogenes en receptores serotoninérgicos y dopaminérgicos, el presente estudio se propuso analizar las frecuencias genotípicas y alélicas de 8 variantes de interés en el TDM, *HTR1A*_rs6295, *HTR2A*_rs6311, *HTR2A*_rs6313, *HTR2A*_rs6314, *HTR6*_rs1805054, *DRD2*_rs1801028, *DRD2*_rs1800497 y *DRD3*_rs6280, en una muestra de pacientes con TDM y controles.

III. Justificación

En México no existen datos específicos para el TDM. En el 2021, la Secretaría de Salud reportó que existen al menos 3.6 millones de personas adultas con depresión¹⁰. Ese mismo año, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI] reportó que el 15.4% de la población mayor de 18 años presentaba síntomas de depresión y que, en el caso de las mujeres este porcentaje se elevaba hasta 19.5%¹¹. El reporte de la Secretaría de Salud también mencionaba que el 73.9% de la población con depresión no recibe tratamiento oportuno¹⁰. Por otro lado, según datos del INEGI, de 2017 a 2022 la tasa de suicidio por cada 100 mil habitantes aumentó de 5.3 a 6.3, relacionando estos datos con la depresión y con la percepción de un bajo o nulo apoyo familiar y social por parte de los pacientes¹².

Otro problema dentro del tratamiento del TDM es el abandono de la terapia por parte de los pacientes debido a falta de resultados. Un estudio hecho en población mestiza mexicana, relacionó el abandono prematuro a variantes genéticas en enzimas metabolizadoras de fármacos¹³. Todos los datos anteriores de prevalencia, falta de tratamiento oportuno, aumento de suicidio, abandono de la terapia, además de la falta de estudios farmacogenómicos sobre la depresión en población mestiza mexicana, hacen que sea de interés investigar variantes

FGX, asociadas a la neurotransmisión, que puedan modificar la respuesta terapéutica y traducirse en beneficios a los pacientes y en mejoras sobre las estadísticas nacionales asociadas a depresión.

IV. Marco teórico

A) Gen *HTR1A*

Este gen codifica para el receptor 1A de serotonina (5-HT_{1A}R, HTR1A), el cual actúa principalmente como autorreceptor y regula negativamente la liberación neuronal de serotonina, vía el acoplamiento con proteína Gi/G0. Se ha observado una actividad incrementada de este receptor en los núcleos del raquí (núcleos situados en el tronco cerebral) de cerebro *post-mortem* de víctimas de suicidio y diagnóstico de depresión. Aunque se ha reportado que después de cierto tiempo los 5-HTR1A pasan por mecanismos de desensibilización, algunas variantes genéticas del receptor pueden alterar la actividad de la serotonina, predisponer a desarrollar depresión o alterar la respuesta a inhibidores selectivos de la serotonina.¹⁴

Una de las variantes asociada a depresión que más ha sido estudiada es la *HTR1A_rs6295* (c.-1019C>G), ubicada dentro de la región promotora que sirve como sitio de unión para proteínas reguladoras¹⁵ como DEAF1/NUDR y HES5/HES1, por lo que altera su unión y modifica la expresión génica. Dichas proteínas reguladoras tienen funciones distintas dependiendo de su ubicación, por ejemplo, el complejo DEAF1, actúa como represor en el núcleo del raquí, mientras que en las neuronas postsinápticas funciona como un potenciador de la transcripción (*enhancer*),¹⁴ por lo que se esperaría que el alelo G aumentará la expresión presináptica, incrementando la inhibición de la liberación de serotonina, al mismo tiempo que disminuye la expresión postsináptica del receptor.

A nivel clínico, diversos estudios han asociado al alelo G con mayor riesgo de desarrollar TDM, trastorno bipolar, o suicidio; así como con una respuesta disminuida al tratamiento con inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina. Esto se ha explicado por una mayor unión al receptor, resultado de la expresión a la alta en ciertas regiones del cerebro, sin embargo, no se descarta que otros factores, como los epigenéticos o la formación de heterorreceptores contribuyan en el efecto observado a nivel clínico.¹⁵

B) Gen *HTR2A*

El receptor 2A de serotonina (5-HT_{2A}R, HTR2A) es codificado por este gen y es uno de los componentes principales de la neurotransmisión serotoninérgica dentro del cerebro y en la periferia con efectos pro excitatorios que promueven la liberación intracelular de calcio.¹⁶ *HTR2A* se expresa principalmente en la corteza prefrontal y en el hipocampo.¹⁷ De entre todas sus funciones, destaca regular la liberación del neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido gamma-aminobutírico) en la amígdala.¹⁸ Este receptor es clave para la patogénesis de la enfermedad, para la respuesta antidepressiva¹⁸ y se ha relacionado con la gravedad de los cuadros de depresión terapéutica.¹⁶

Dos de las variantes más estudiadas de este gen son *HTR2A_rs6311* (-1438G>A) y *HTR2A_rs6313* (102C>T; p.Ser34=), que además se encuentran en desequilibrio de ligamiento y aunque no cambian la estructura proteica del receptor, sí afectan su expresión. La variante *HTR2A_rs6311* se ha relacionado también con la severidad del TDM,¹⁹ ya que diversos estudios han reportado que el alelo A favorece la unión para potenciadores²¹ y factores de transcripción específicos,²⁰ regulando de manera específica a ciertos tejidos y zonas del cerebro. En cuanto a los efectos clínicos de la variante sobre la respuesta antidepressiva, algunos estudios describen que los pacientes homocigotos AA presentan una respuesta disminuida vs. los pacientes con genotipo GG,²² sin embargo otras investigaciones no han encontrado efectos singificativos.²³ Por otro lado, la variante sinónima *HTR2A_rs6313* se ha relacionado con la regulación de la expresión a través de la metilación de islas CpG cercanas, observando una hipometilación en los portadores del alelo C.²⁴

Por último, la variante *HTR2A_rs6314* (c.1354C>T; p.His452Tyr) se relaciona con una actividad disminuida del receptor, los portadores del alelo T presentan hipermetilación en distintas islas CpG, que afectan la expresión²⁴ y disminuyen la respuesta farmacológica.²⁵

C) Gen *HTR6*

Este gene codifica al receptor tipo 6 de serotonina se expresa principalmente en corteza prefrontal, hipocampo, amígdala y estriado, participa en la activación de neuronas gabaérgicas y regula diversos sistemas de neurotransmisores como la dopamina, glutamato, serotonina y acetilcolina, por lo que *HTR6* se ha relacionado con la fisiopatología de los trastornos del estado de ánimo.²⁶

Una de las variantes más estudiadas en el TDM y en la respuesta farmacológica antidepressiva es *HTR6_rs1805054* (c.267T>C; p.Tyr89=), sin embargo, no se ha encontrado asociación con la enfermedad o la respuesta farmacológica^{27,28} y sólo existe un trabajo que apoya al genotipo heterocigoto CT con predisposición a una mejor respuesta farmacológica.²⁹

D) Gen *DRD2*

El receptor tipo 2 de dopamina es un receptor que pertenece a la familia D2, se expresa principalmente en el hipocampo, el estriado, el tálamo, la sustancia negra y la hipófisis. Diversos agonistas de este receptor, tales como el ropirinol y el pramipexol, han demostrado tener actividad antidepressiva a través de neurogénesis o regulación de enzimas implicadas en síntesis y transporte de catecolaminas.³⁰ Los distintos tipos de receptores de la dopamina son capaces de asociarse y formar heterodímeros, por ejemplo, un estudio encontró una mayor densidad de heterodímeros D1/D2 en tejido cerebral *post-mortem* de pacientes con TDM.

La variante *DRD2_rs1801028* (c.932C>G; p.Ser311Cys) cuando se presenta en estado homocigoto representa un riesgo incrementado para desarrollar esquizofrenia³¹ y se asocia con poca respuesta a fármacos como la risperidona.³² Algunos estudios han investigado el papel de esta variante en la respuesta al tratamiento con antidepressivos, sin embargo, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas.³⁶

La variante *DRD2_rs1800497* (c.2137G>A; p.Glu713Lys), también conocida como *TaqIA* se encuentra dentro de la región codificante de *ANKK1*, a más de 10 000 pb de *DRD2*, y sin

embargo se le relaciona con una menor densidad cerebral del receptor de dopamina.³⁴ El alelo A, antes conocido como alelo *DRD2*AI*, tiene un comportamiento mendeliano dominante y se asocia a una menor expresión del gen que clínicamente se traduce en un aumento de la severidad de los síntomas depresivos.³⁵ Adicionalmente, esta variante se asocia con comorbilidades del TDM como el alcoholismo³⁴ y el suicidio.³⁶

E) Gen *DRD3*

Al igual que el receptor DRD2, el receptor codificado por este gen, también pertenece a la familia D2, su función es muy similar, ya que actúa como sensor de las concentraciones extracelulares de dopamina para controlar su síntesis, además de que algunos de sus agonistas han presentado efectos antidepresivos.³⁰ Específicamente, se ha observado que la estimulación de DRD3 por el pramipexol es responsable del efecto antidepresivo en pacientes con enfermedad de Parkinson.³⁷

Una de las variantes de mayor interés en la depresión secundaria a enfermedad de Parkinson es la *DRD3_rs6280* (c.25C>T; p.Gly9Ser)³⁸ que también se ha relacionado con el desarrollo de comportamientos obsesivo-compulsivos en pacientes con TDM.³⁹ En cuanto a la respuesta al tratamiento farmacológico, se ha documentado que los pacientes homocigotos para el alelo alternativo (TT) presentan respuesta disminuida a la paroxetina, un ISRS.⁴⁰

F) PCR-RFLP

Uno de los métodos más utilizados para la genotipificación de variantes de un solo nucleótido (SNV) es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (qPCR) que requiere sondas de hidrólisis tipo TaqMan®. Esta qPCR es rápida, sensible, específica y reproducible, sin embargo, el precio de las sondas, hace que el método sea costoso a la hora de estudiar grandes poblaciones.⁴¹

Un método alternativo, barato y simple es la PCR acoplada a los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP por sus siglas en inglés, *restriction fragment length polymorphism*) que mantiene la especificidad usando un termociclador de punto final y una cámara de electroforesis⁴². Este método necesita una enzima de restricción o endonucleasa, generalmente de origen bacteriano que reconoce una secuencia específica palindrómica o espejo.⁴³

Para llevar a cabo este método, solo se necesitan cuatro pasos consecutivos:⁵²

1. Amplificación por PCR convencional o punto final de un amplicón que contenga la SNV de interés.
2. Verificación de la amplificación específica por número de amplicones y tamaños en pares de bases (pb) en una electroforesis horizontal.
3. Digestión del amplicón con una enzima de restricción específica que reconozca una secuencia de aproximadamente 4-8 pb e incluya a la variante estudiada.
4. Observación del patrón de bandeo (fragmentos del amplicón) en un gel de agarosa de mayor concentración (o geles de poliacrilamida verticales).

Algunos puntos importantes para el desarrollo de este método son: (1) la estandarización de las condiciones de la PCR punto final para obtener un solo amplicón, (2) la especificidad sin bandas adicionales (amplicones inespecíficos); (3) así como también las condiciones de la reacción de restricción para asegurar una digestión completa y evitar confusiones en la interpretación de los resultados, (4) la elección de la enzima de restricción considera las secuencias adyacentes al sitio de la variante y se procura que el sitio de restricción sea único en el amplicón. Una limitante de la PCR-RFLP es la resolución por electroforesis,⁵² a diferencia de la qPCR.⁴¹

V. Objetivos

A) Objetivo General

Determinar el impacto de las variantes genéticas en receptores de neurotransmisores en el trastorno depresivo mayor en población mestiza mexicana.

B) Objetivos Específicos

- Identificar las variantes genéticas en receptores de dopamina y serotonina en pacientes mexicanos con TDM.
- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de variantes genéticas en receptores de dopamina y serotonina en pacientes mexicanos con TDM y en individuos controles sanos mestizos mexicanos.
- Comparar las frecuencias genotípicas y alélicas de variantes genéticas en receptores de dopamina y serotonina con otras poblaciones.
- Evaluar el impacto de las variantes genéticas en receptores de dopamina y serotonina asociadas con la respuesta al tratamiento antidepressivo en pacientes con TDM.

VI. Metodología

Descripción del estudio

El estudio realizado corresponde a un estudio observacional y descriptivo sobre el impacto de las variantes genéticas en receptores serotoninérgicos y dopaminérgicos sobre la respuesta farmacológica a la terapia antidepressiva de pacientes mestizos mexicanos con TDM. La metodología general se describe en la **Figura 1**.

A) Selección de las muestras

La selección de las muestras se realizó a partir de las muestras recolectadas en el estudio del proyecto aprobado por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNNMVS) y financiado por CONACyT no. 59366.¹³ Las muestras de controles fueron seleccionadas de un banco de DNA de muestras de controles clínicamente sanos (CT) del INNNMVS y de la UAM-Xochimilco (Proyecto No. 34605034). Los CT se parearon con los Px por sexo y edad (considerando ± 5 años). Estas muestras se obtuvieron siguiendo todos los requerimientos éticos y legales, previa carta de consentimiento de los participantes.

B) Análisis cuantitativo y cualitativo del DNA genómico

Todas las muestras fueron cuantificadas en el equipo *Thermo Scientific™ NanoDrop™ One* para el análisis de su concentración y pureza. La concentración de las muestras se determinó mediante la absorbancia una longitud de onda de 260 nm, las condiciones óptimas de pureza se determinaron de acuerdo a los siguientes parámetros: valores de 1.8-2.0 para la relación de absorbancias a 260/280 y un valor >1.8 para la relación A260/230. En las lecturas se utilizó 1 µL de agua libre de nucleasas como blanco y se analizó 1 µL de cada una de las muestras por duplicado. Las muestras de trabajo correspondieron a muestras con una concentración de 50 ng/µL de DNA (verificadas por duplicado en *NanoDrop*).

La integridad y el peso molecular se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 100 V durante 38 min. Se empleó TBE 1X [TRIS, ácido bórico, EDTA] como solución amortiguadora, se aplicaron 5 µL de cada muestra con 2 µL de solución de carga con colorante *GelRed 6x*, y marcador de 100 pb *Solis BioDyne® 100 pb DNA Ladder Ready to Load* mezclado con la misma cantidad de solución de carga. Los parámetros óptimos considerados fueron muestras que no presentaran degradación y tuvieran un alto peso molecular.

C) Genotipificación por PCR-RFLP

1) Obtención de los amplicones

Se analizaron un total de ocho variantes genéticas asociadas al TDM o a la respuesta farmacológica de antidepresivos. Las variantes pertenecen a tres genes que codifican receptores de serotonina y dos genes de receptores dopaminérgicos. Se realizó una revisión de la literatura para seleccionar los oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada una de las variantes. Las condiciones de reacción de PCR sólo se encontraron para 6 de las 8 variantes, estas se probaron y se modificaron en caso de ser necesario. Todas las amplificaciones se verificaron *in silico* con la herramienta *Primer-BLAST* de la base de datos del NCBI.

La estandarización de las condiciones de amplificación de las 2 variantes (sin información previamente reportada), se realizó mediante gradientes de concentración de DNA y de temperatura. Las condiciones finales de amplificación para las variantes (**Tabla 1**) emplearon la mezcla comercial Mix 2G de la marca *Kapa* en un volumen de reacción de 12 µL, como sigue:

- 6 µL de mezcla de reacción comercial con los ingredientes para PCR (*master mix*)
- 1 µL oligonucleótido sentido [10uM] (F)
- 1 µL oligonucleótido antisentido [10uM] (R)
- 1 µL de DNA [50 ng/µL]
- 3 µL de agua libre de nucleasas.

Tabla 1. Condiciones para la amplificación de cada una de las variantes.

Variante	Oligonucleótidos	Tamaño del	Condiciones de reacción	Referencia
----------	------------------	------------	-------------------------	------------

		amplicón (pb)		
<i>HTR1A</i>				
rs6295	<p>F: 5'- GGCTGGACTGTTAGATGATAACG-3' (Tm=58.95°C)</p> <p>R: 5'- GGAAGAAGACCGAGTGTGTCAT-3' (Tm=60.03°C)</p>	163	<p>Desnaturalización inicial 5 min a 90°C</p> <p>35 ciclos de: 95°C/30 s, 59.5°C/40 s, 72°C/50 s.</p> <p>Extensión final a 72°C / 5 min.</p>	44
<i>HTR2A</i>				
rs6311	<p>F: 5'- TGCTAATAGTTTATCAGAGTTATCACCA CA-3' (Tm= 60.59°C)</p> <p>R: 5'- TGCAGATTCCCATTAAGGTAGGTA A-3' (Tm=59.57°C)</p>	234	<p>Desnaturalización inicial a 94°C/5 min</p> <p>30 ciclos de: 94°C/30 s, 56°C/30 s, 72°C/30 s</p> <p>Extensión final a 72°C /5 min.</p>	45
rs6313	<p>F: 5'- CAAGGTGAATGGTGAGCAGAAA-3' (Tm=59.11°C)</p> <p>R: 5'- TGGCAAGTGACATCAGGAAATA-3' (Tm=57.70°C)</p>	427	<p>Desnaturalización inicial a 94°C/8 min</p> <p>40 ciclos: 94°C/30 s, 55°C/30 s, 72°C/30 s.</p> <p>Extensión final a 72°C/10 min.</p>	46

rs6314	<p>F: 5'-CAAAGCAAGATGCCAAGACA-3' (T_m= 56.91°C)</p> <p>R: 5'-GGCATAACAGATATGATCGTTGG-3' (T_m= 56.80°C)</p>	249	<p>Desnaturalización inicial a 94°C/5 min</p> <p>30 ciclos de 94°C/30 s, 52°C/30 s, 72°C/30 s.</p> <p>Extensión final a 72°C/5 min.</p>	47
HTR6				
rs180505 4	<p>F: 5'-TGCTGATCGCGCTCATCTGCACTC-3' (T_m= 67.52°C)</p> <p>R: 5'-CTGCAGCGTCTCCGAGGCTGACTG-3' (T_m= 70.80°C)</p>	578	<p>Desnaturalización inicial a 94°C/3 min.</p> <p>30 ciclos de 94°C/30 s, 60°C/30 s, 72°C/30 s.</p> <p>Extensión final a 72°C/3 min.</p>	48
DRD2				
rs180102 8	<p>F: 5'-ACCAGCTGACTCTCCCCGACCGGT-3' (T_m= 70.94°C)</p> <p>R: 5'-GGAAGGACATGGCAGGGAATGGGAC-3' (T_m= 67.14°C)</p>	299	<p>Desnaturalización inicial a 95°C/3 min</p> <p>35 ciclos: 95°C/30 s, 55°C/30 s, 72°C/30 s.</p> <p>Extensión final a 72°C/3 min.</p>	49
rs180049 7	<p>F: 5'-CCTTCCTGAGTGTCAATCAAC-3' (T_m=55.77°C)</p> <p>R: 5'-ACGGCTCCTTGCCCTCTAG-3' (T_m=61.06°C)</p>	237	<p>Desnaturalización inicial a 94°C/5 min.</p>	50

			30 ciclos: 95°C/30 s, 59°C/30 s, 72°C/30 s. Extensión final a 72°C/5 min.	
--	--	--	---	--

DRD3

rs6280	F: 5'-GCTCTATCTCCAACCTCTCACA-3' (Tm=56.56°C) R: 5'-AAGTCTACTCACCTCCAGGTA-3' (Tm=56.89°C)	463	Desnaturalización inicial a 94°C/8 min 35 ciclos: 94°C/1 min, 55°C/30 s, 72°C/60 s Extensión final a 72°C/10 min.	51
--------	---	-----	--	----

Notas: F= *forward* (secuencia sentido), R= *reverse* (secuencia antisentido),
Tm=temperatura de alineamiento.

2) Resolución de amplicones y RFLP, mediante electroforesis en geles de agarosa

Para determinar la concentración óptima de agarosa, se realizaron diversas pruebas a concentraciones de 3 y 4% con agarosa marca *Axygen AGR-LE-500*, disuelta en TBE 1X, usando los marcadores de pesos de 25 pb y 100 pb (*GeneRuler Low Range DNA Ladder* y *Solis BioDyne® 100 pb DNA Ladder Ready to Load, respectivamente*).

La resolución de los amplicones se realizó en geles al 2%, a 100 V por 37 min, mientras que, en el caso de la RFLP, esta se resolvió con geles al 3% a 100 V por 60 min.

3) Selección de las enzimas de restricción

A partir de las secuencias obtenidas en la simulación *in silico* de cada una de las amplificaciones y con ayuda del programa *SnapGene* para la digestión virtual, se seleccionaron las enzimas de restricción para cada una de las variantes. En la **Tabla 2** se presentan las secuencias amplificadas y los sitios de interés dentro de ellas.

Tabla 2. Análisis de las secuencias obtenidas *in silico*

Variante	Enzima de restricción	Secuencia amplificada
----------	-----------------------	-----------------------

<p><i>HTR1A</i>_rs6295 (c.-1019C>G)</p>	<p>BseGI 5'-GGATG NN↓-3' 3'-CCTAC↑NN-5'</p>	<p>5'- GGCTGGACTGTTAGATGATAACG GAGG TACCGTTTTGTTGTTGTTGTCGTCGTTG TTCGTTTTGTTTTGGAGACGGAGTCTC GCTCTGTCGCCAGGCTGGAGTGCAAT GGCGCGAGAACGGAGGTAGCTTTTTAA AAA CGATGAC↓ACACTCGGTCTTCTTCC -3'</p>
<p><i>HTR2A</i>_rs6311 (c.-1438G>A)</p>	<p>Msp I 5'-C↓CGG-3' 3'-GGC↑C-5'</p>	<p>5'- TGCTAATAGTTTATCAGAGTTATCACCA CAGACGTGCCTAGCCACCCTGAGCCTA TGTGGCCAATGTCAGTAATTCCACTCT GGACACAAACACTGTTGGCTTTGGATG GAAGTG C↓CGG ACACTCACAGCACTCC GAGGACATACTGTTTTCTAGCCTTATTT ATGTTCTCTTTCACCCTTCAGCCTAAA AAATTACCACAGTGCCAC TTACCTACC TTAATGGGAATCTGCA-3'</p>
<p><i>HTR2A</i>_rs6313 (c.102C>T)</p>	<p>Msp I 5'-C↓CGG-3' 3'-GGC↑C-5'</p>	<p>5'- CAAGGTGAATGGTGAGCAGAAA CTATA ACCTGTTAGTCCTTCTACACCTCATCTG CTACAAGTTCTGGCTTAGACATGGATAT TCTTTGTGAAGAAAATACTTCTTTGAG CTCAACTACGAACTCCCTAATGCAATT AAATGATGACACCAGGCTCTACAGTAA TGACTTTAACT C↓CGG AGAAGCTAACA CTTCTGATGCATTTAACTGGACAGTCG ACTCTGAAAATCGAACCAACCTTTCTCT GTGAAGGGTGCCTCTCACCGTCGTGTC TCTCCTTACTTCATCTCCAGGAAAAAA ACTGGTCTGCTTTACTGACAGCCGTAG TGATTATTCTAACTATTGCTGGAAACAT ACTCGTCATCATGGCAGTGTCCCTAGA GAAAAAGCTGCAGAATGCCACCAACT ATTTCCTGATGTCACCTTGCCA-3'</p>
<p><i>HTR2A</i>_rs6314 (c.1354C>T)</p>	<p>Lsp 1109I 5'-GCAGC(N)8↓-3' 3'-CGTCG(N)12↑- 5'</p>	<p>5'- CAAAGCAAGATGCCAAGACA ACAGAT AATGACTGCTCAATGGTTGCTCTAGGA AA GCAGCATTCTGAA↓ GAGGCTTCTAA AGACAATAGCGACGGAGTGAATGAAA AGGTGAGCTGTGTGTGATAGGCTAGTT GCCGTGGCAACTGTGGAAGGCACACT</p>

		GAGCAAGTTTTACCTATCTGGAAAA AAAAAATATGAGATTGGAAAAATTAG ACAAGTCTAGTGGAA CCAACGATCATA TCTGTATGCC -3'
<i>HTR6</i> _rs1805054 (c.267T>C)	Rsa I 5'-GT↓AC-3' 3'-CA↑TG-5'	5'- TGCTGATCGCGCTCATCTGCACTC AGC CCGCGCTGCGCAACACGTCCAACTTCT TCCTGGTGTGCTCTTACGTCTGACC TGATGGTGGGGCTGGTGGTGATGCCGC CGGCCATGCTGAACGCGCT GT↓AC GGG CGCTGGGTGCTGGCGCGCGGCCTCTGC CTGCTCTGGACCGCCTTCGACGTGATG TGCTGCAGCGCCTCCATCCTCAACCTC TGCCTCATCAGCCTGGACCGCTACCTG CTCATCCTCTCGCCGCTGCGCTACAAG CTGCGCATGACGCCCTGCGTGCCCTG GCCCTAGTCCTGGGCGCCTGGAGCCTC GCCGCTCTCGCCTCCTTCCCTGCCCTG CTGCTGGGCTGGCACGAGCTGGGCCA CGCACGGCCACCCGTCCCTGGCCAGTG CCGCCTGCTGGCCAGCCTGCCTTTTGT CCTTGTGGCGTCGGGCCTCACCTTCTT CCTGCCCTCGGGTGCCATATGCTTCAC CTACTGCAGGATCCTGCTAGCTGCCCG CAAGCAGGCCGTGCAGGTGGCCTCCC TCACCACCGGCATGGC CAGTCAGGCCT CGGAGACGCTGCAG -3'
<i>DRD2</i> _rs1801028 (c.932C>G)	Cfr13I 5'-G↓GNCC-3' 3'-CCNG↑G-5'	5'- ACCAGCTGACTCTCCCCGACCG↓GTCC CACCATGGTCTCCACAGCACTCCCGAC AGCCCCGCCAAACCAGAGAAGAATGG GCATGCCAAAGACCACCCCAAGATTGC CAAGATCTTTGAGATCCAGACCATGCC CAATGGCAAACCC G↓GACC TCCCTCA AGACCATGAGCCGTAGGAAGCTCTCCC AGCAGAAGGAGAAGAAAGCCACTCAG ATGCTCGCCATTGTTCTCGGTGAGTC G↓ GCCC TGGCTGCTGGCCACAGCCCGGTC TGTGAAA G↓GTCC CATTCCCTGCCATGT CCTTCC -3'

<p><i>DRD2</i>_rs1800497 (c.2137G>A)</p>	<p>Taq I 5'-T↓CGA-3' 3'-AGC↑T-5'</p>	<p>5'- ACGGCTCCTTGCCCTCTAGGAAGGACA TGATGCCCTGCTTTCGGCTGCGGAGGG CCAGTTGCAGGGGTGTGCAGCTCACTC CATCCTGGACGTCCAGCTGGGCGCCTG CCT↓CGACCAGCACTTTGAGGATGGCT GTGTTGCCCTTGAGGGCGGCCAGGTG GGCGGGTGTCCAGCCCACCTTGTTGCG GGCGTGGACATTTGCGTGATGTTCTAG GAGGTTGATGACACTCAGGAAGG-3'</p>
<p><i>DRD3</i>_rs6280 (c.25C>T)</p>	<p>MscI 5'-TGG↓CCA-3' 3'-ACC↑GGT-5'</p>	<p>5'- GCTCTATCTCCAACTCTCACAACAGTG CCTACTATATAGAAAATGCTCAATAAAT ATTTGCTGATGCAATAAATAAAAAAAT GTAACTAAGCAACCAAGCCCCAAAGA GTCTGATTTTATTAATATTGTTTTCTGTC TCCTCACAGGAAGCCCCTTGGCATCAC GCACCTCCCTCTGGGCTATGGCATCTCT GAGCCAGCTGAGTGG↓CCACCTGAACT ACACCTGTGGGGCAGAGAACTCCACA GGTGCCAGCCAGGCCCGCCACATGCC TACTATGCCCTCTCCTACTGCGCGCTCA TCCTGG↓CCATCGTCTTCGGCAATGGCC TGGTGTGCATGGCTGTGCTGAAGGAGC GGGCCCTGCAGACTACCACCAACTACT TAGTAGTGAGCCTGGCTGTGGCAGACT TGCTGGTGG↓CCACCTTGGTGATGCC TGGGTGGTATTACCTGGAGGTGAGTAGA CTT-3'</p>

En azul se resaltan las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos, en verde los sitios de restricción presentes en la secuencia amplificada, la flecha indica el sitio de corte. En gris se indica superposición del sitio de restricción y las secuencias de los oligonucleótidos, el nucleótido en color rojo muestra al alelo analizado de cada variante.

4) Digestión de los amplicones

Cada amplicón se digirió con las enzimas mostradas en la **Tabla 2**. En todos los casos, excepto para las variantes *HTR2A*_rs6311 y *HTR2A*_rs6313 se usaron enzimas de rápida procesividad *FastDigest*®, el tiempo de digestión fue de 15 min a 37°C, excepto para la enzima *TaqI* que fue de 65°C, los volúmenes de reacción fueron de 15 µL y consistieron de:

- 0.3 µL de enzima endonucleasa
- 1.5 µL de amortiguador de digestión
- 5 µL de producto de PCR (amplicón)
- 8.2 µL de agua libre de nucleasas.

En el caso de las variantes *HTR2A_rs6311* y *HTR2A_rs6313* se endonucleasas convencionales y se digirió durante una noche (10 h). El volumen de reacción también fue de 15 µL y se compuso de:

- 0.5 µL de enzima endonucleasa
- 1.5 µL de amortiguador *Tango*
- 5 µL de producto de PCR
- 8 µL de agua libre de nucleasas.

Los patrones de bandeo obtenidos de cada una de las digestiones se resolvieron en geles de agarosa al 3% teñidos con GelRed 1000 X de la marca *Biotium*, en cada pocillo se cargaron 15 µL de producto digerido + 3 µL del colorante de carga de ADN *TriTrack (6X)*, como marcador de peso molecular se usaron 2 µL de 3 reactivos distintos correspondientes a escaleras de 25, 50 y 100 pb, según la disponibilidad, + 2 µL de *TriTrack (6X)*. Las condiciones de electroforesis fueron: 60 min a 100 V.

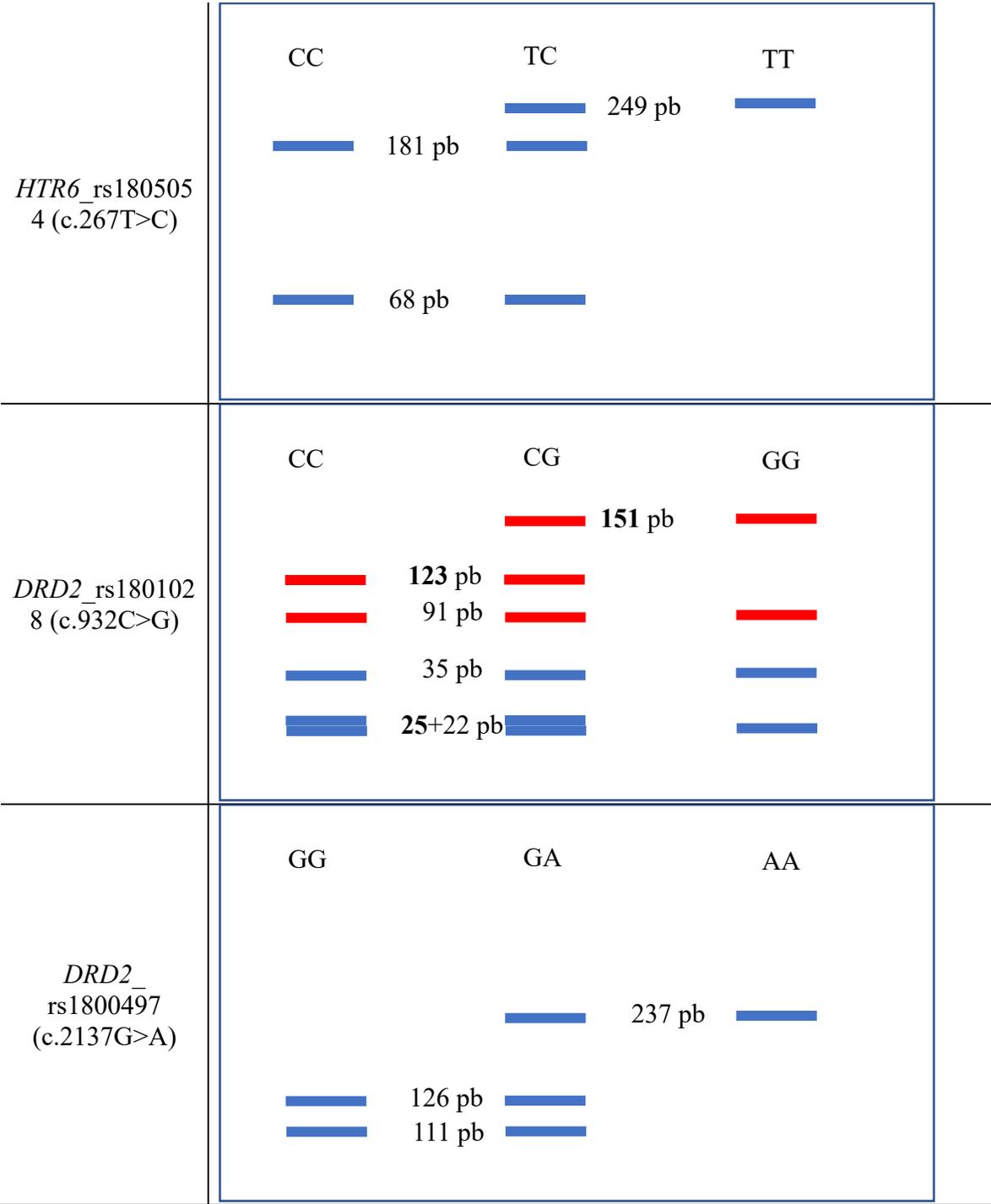
5) Interpretación teórica de resultados

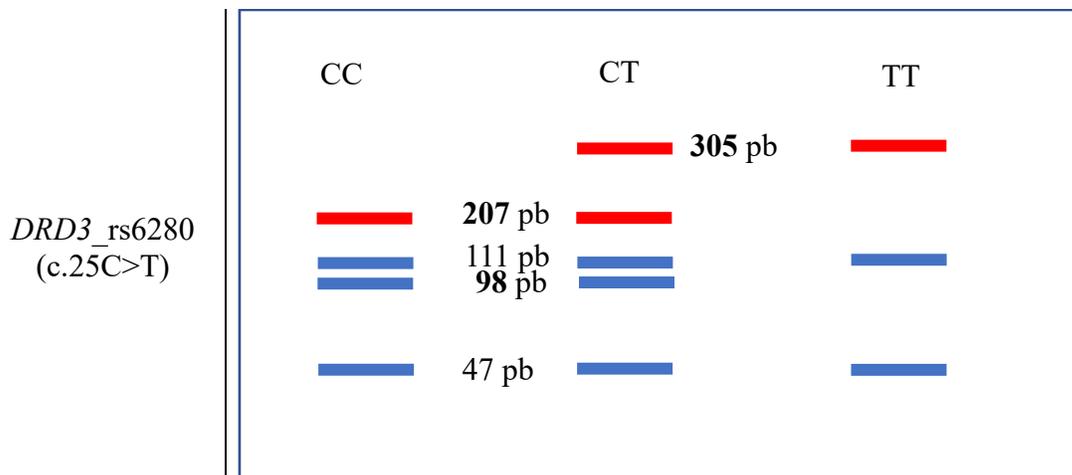
Los resultados obtenidos en los geles de agarosa al 3% se resolvieron según los sitios de restricción indicados en la **Tabla 2**, los patrones de bandeo esperados correspondientes a cada uno de los genotipos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Patrones de bandeo correspondientes a cada genotipo

Variante	Patrones esperados		
<i>HTR1A_rs6295</i> (c.-1019C>G)	CC	CG	GG
	 163 pb	 146 pb	
		 17 pb	

<p><i>HTR2A</i>_rs6311 (c.-1438G>A)</p>	<p>GG GA AA</p> <p> 234 pb 234 pb</p> <p>116+118 pb 116+118 pb</p>
<p><i>HTR2A</i>_rs6313 (c.102C>T)</p>	<p>CC CT TT</p> <p> 427 pb 427 pb</p> <p>251 pb 251 pb</p> <p>176 pb 176 pb</p>
<p><i>HTR2A</i>_rs6314 (c.1354C>T)</p>	<p>CC CT TT</p> <p> 249 pb 249 pb</p> <p>181 pb 181 pb</p> <p>68 pb 68 pb</p>





Nota: para las variantes *DRD2_rs1801028* y *DRD3_rs6280* debido a la presencia de múltiples bandas, se muestran en rojo aquellas que se emplearon para asignar los genotipos correspondientes. Pb, pares de bases.

D) Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del programa *GraphPad Prism 8.0*, excepto cuando se indique lo contrario.

1) Equilibrio de Hardy-Weinberg

Los resultados de los genotipos se agruparon para calcular las frecuencias genotípicas y alélicas correspondientes, y se construyeron las tablas de contingencia como se ejemplifica en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Ejemplo de tabla de contingencia para el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg

Genotipos	Observados				Esperados		$\frac{(N_o - N_e)^2}{N_e}$
	N _o	FG	A	FA	N _e	FG	
Pp	x	x/T	(2x)+(y)	p	p ² *T	x _e	a
Pq	y	y/T			2pq*T	y _e	B
Qq	z	z/T	(2z)+(y)	q	q ² *T	z _e	C
Total	T	1	2T	1	T	1	$\chi^2=a+b+c$

FG: frecuencia genotípica, **A:** alelos, **FA:** frecuencia alélica. No, número observado y Ne, número esperado.

El valor de χ^2 fue usado como estadístico de prueba (1 grado de libertad, $\alpha=0.05$) 3.84.

2) Comparación de frecuencias

Para la comparación de frecuencias entre dos grupos, se usaron dos pruebas estadísticas distintas, la prueba de χ^2 y la prueba exacta de Fisher, la elección de esta se hizo dependiendo de las dimensiones de la tabla de contingencia a analizar.

Cuando la tabla de contingencia de los datos analizados tenía dimensiones de 2x2 se utilizó la prueba exacta de Fisher, por otro lado, si las dimensiones eran mayores, se hizo un primer análisis con la prueba de χ^2 y sólo en caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas, se parearon cada uno de las columnas para analizarse de forma independiente con la prueba exacta de Fisher.

Finalmente se calcularon los OR (*Odds ratio*) en los casos donde se encontraron diferencias significativas.

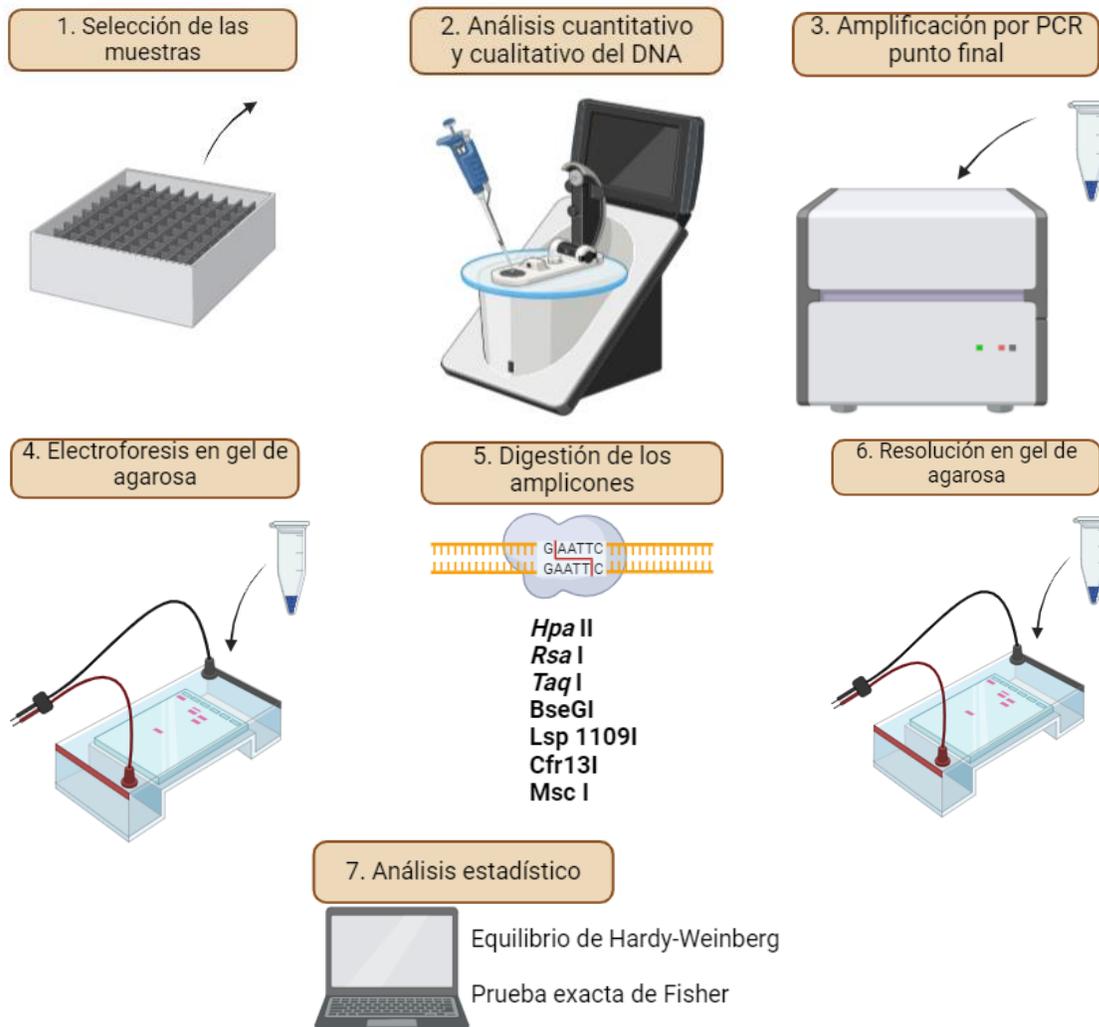


Figura 1. Diagrama de la metodología seguida

VII. Resultados

A) Descripción de la muestra

Se analizaron 49 muestras de pacientes mexicanos con diagnóstico de TDM (**Px**), así como 50 muestras control (**Ct**) tomadas del banco de DNA del laboratorio de Genética Molecular N-103. Todas las muestras se encontraron dentro de los parámetros óptimos durante el

análisis cuantitativo y cualitativo. Las características demográficas se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Características demográficas de la muestra

Grupo	Individuos (N)	Características		
		Masculino N (%)	Femenino N (%)	Edad (años±DE)
Px	49	9 (18.37)	40 (81.63)	37.11±11.51
Ct	50	13 (26.00)	37 (74.00)	31.9±10.50
Total	99			

Notas: **Px**= pacientes, **Ct**= controles, **DE**= desviación estándar

B) Genotipificación de la variante *HTR1A*_rs6295

Se identificaron los tres genotipos CC, GG y CG de la variante (**Figura 2**).

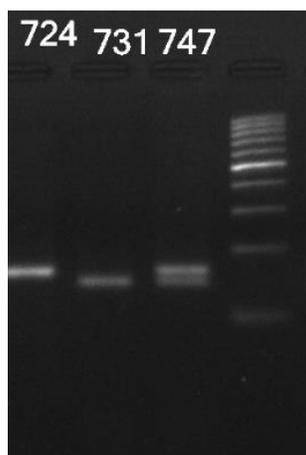


Figura 2. Imagen representativa con los genotipos de la variante *HTR1A*_rs6295. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de las muestras 724, 731 y 747 con genotipos CC, GG y CG, respectivamente. A la derecha, se muestra marcador de peso molecular de 100 pb (*Solis BioDyne® 100 pb DNA Ladder Ready to Load*).

Una vez identificados los patrones de bandeo, se obtuvieron los siguientes resultados para los controles y pacientes.

1) Controles

Los resultados de la PCR-RFLP identificaron 13 homocigotos *wild type*, 19 heterocigotos y 18 homocigotos para la variante *HTR1A*_rs6295 en controles. Los resultados del análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas, así como el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Genotipificación de la variante *HTR1A*_rs6295 en el grupo control

Genotipos	Observados				Esperados		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	A	FA	N	FG	
CC	13	0.26	45	0.45	10.13	0.20	0.816

CG	19	0.38			24.75	0.50	1.336
GG	18	0.36	55	0.55	15.13	0.30	0.546
Total	50	1	100	1	50	1	$\chi^2=2.699^*$

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

* χ^2 calculada < χ^2 tablas

2) Pacientes

Se identificaron 8 pacientes homocigotos *wild type*, 37 heterocigotos y 4 homocigotos para *HTR1A_rs6295*, las frecuencias genotípicas no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, los resultados se observan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Genotipificación de la variante *HTR1A_rs6295* en el grupo de pacientes

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
CC	8	0.16	53	0.54	14.33	0.29	2.797
CG	37	0.76			24.34	0.50	6.589
GG	4	0.08	45	0.46	10.33	0.21	3.880
Total	49	1	98	1	49	1	13.267

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

χ^2 calculada > χ^2 tablas

C) Genotipificación de la variante *HTR2A_rs6311*

Los resultados del patrón de bandeo para cada uno de los genotipos de esta variante coincidieron con aquellos esperados, en la **Figura 3** se muestran los patrones para los genotipos GG (*wild type*), AA (homocigoto para la variante) y GA (heterocigoto), respectivamente.

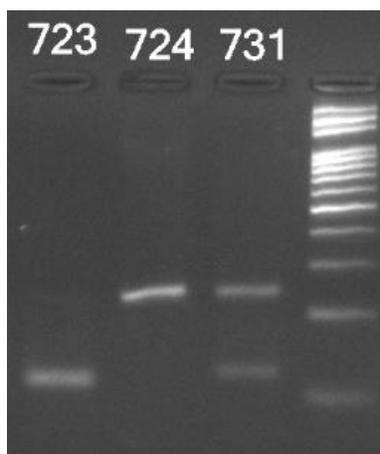


Figura 3. Imagen representativa con los genotipos de la variante *HTR2A_rs6311*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de las muestras 723, 724 y 731 con genotipos GG, AA y GA, respectivamente. A la derecha, se muestra marcador de peso molecular de 100 pb (*Solis BioDyne® 100 pb DNA Ladder Ready to Load*).

1) Controles

Se encontraron 20 individuos homocigotos *wild type*, 23 heterocigotos y 7 portadores de la variante en estado homocigoto. Las frecuencias observadas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los resultados se resumen en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Genotipificación de la variante *HTR2A*_rs6311 en el grupo control

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
AA	7	0.14	37	0.37	6.85	0.14	0.004
GA	23	0.46			23.31	0.46	0.004
GG	20	0.4	63	0.63	19.84	0.40	0.001
Total	50	1	100	1	50	1	0.009*

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

* χ^2 calculada < χ^2 tablas

2) Pacientes

Se identificaron 24 pacientes homocigotos, 19 portadores de la variante en estado heterocigoto y 6 homocigotos a la variante, las frecuencias obtenidas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, tal como se muestra en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Genotipificación de la variante *HTR2A*_rs6311 en el grupo de pacientes

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
AA	6	0.12	31	0.32	4.90	0.10	0.245
GA	19	0.39			21.19	0.43	0.227
GG	24	0.49	67	0.68	22.90	0.47	0.053
Total	49	1	98	1	49	1	0.525*

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

* χ^2 calculada < χ^2 tablas

D) Genotipificación de la variante *HTR2A*_rs6313

En la **Figura 4** se ilustran los patrones de bandeo característicos a los genotipos homocigoto *wild type* (CC), homocigoto a la variante (TT) y heterocigoto (CT), respectivamente. El número y peso molecular de las bandas coincidieron con los esperados.

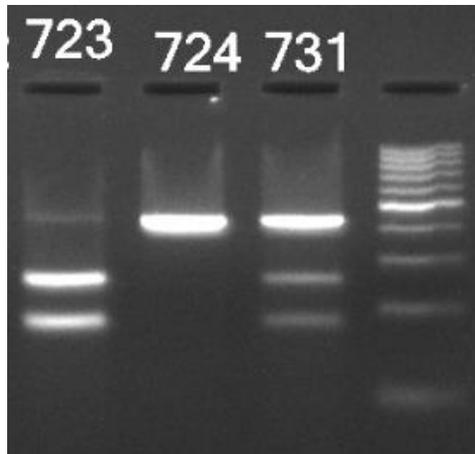


Figura 4. Imagen representativa con los genotipos de la variante *HTR2A_rs6313*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de las muestras 723, 724 y 731 con genotipos CC, TT y CT, respectivamente. A la derecha, se muestra marcador de peso molecular de 100 pb (*Solis BioDyne® 100 pb DNA Ladder Ready to Load*).

1) Controles

Dentro de los controles se encontraron 20 individuos portadores de la variante *wild type*, 23 portadores heterocigotos y 7 portadores homocigotos de la variante T, las frecuencias genotípicas obtenidas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, tal y como se resume en la **Tabla 10**.

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
CC	20	0.4	63	0.63	19.85	0.40	0.001
CT	23	0.46			23.31	0.47	0.004
TT	7	0.14	37	0.37	6.85	0.14	0.004
Totales	50	1	100	1	50	1	0.009*

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

* χ^2 calculada < χ^2 tablas

2) Pacientes

De los 49 pacientes estudiados, se identificaron 26 homocigotos *wild type*, 17 portadores heterocigotos y 6 portadores homocigotos del alelo T, las frecuencias genotípicas encontradas estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg (**Tabla 11**).

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
CC	26	0.53	69	0.70	24.29	0.50	0.120
CT	17	0.35			20.42	0.42	0.572
TT	6	0.12	29	0.30	4.29	0.09	0.681

Totales	49	1.00	98	1.00	49.00	1.00	1.373*
----------------	----	------	----	------	-------	------	--------

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

* χ^2 calculada < χ^2 tablas

E) Genotipificación de la variante *HTR2A_rs6314*

Los patrones de bandeo para esta variante fueron los esperados, en la **Figura 5**, se observan los patrones de bandeo para un genotipo TT, CC y dos CT, respectivamente.

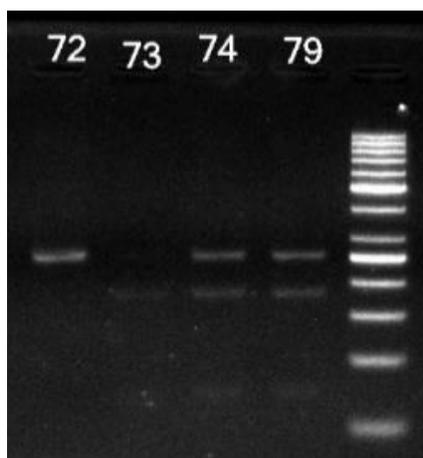


Figura 5. Imagen representativa con los genotipos de la variante *HTR2A_rs6314*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de las muestras 72, 73, 74 y 79 con genotipos TT, CC, CT y CT, respectivamente. A la derecha, se muestra marcador de peso molecular de 50 pb (*50 bp GeneRuler*).

1) Controles

Se identificaron 26 individuos sanos con genotipo CC, 15 CT y 9 TT, las frecuencias calculadas no estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg (véase **Tabla 12**).

Tabla 12. Genotipificación de la variante *HTR2A_rs6314* en el grupo control

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
CC	26	0.52	67	0.67	22.45	0.45	0.563
CT	15	0.3			22.11	0.44	2.286
TT	9	0.18	33	0.33	5.45	0.11	2.321
Total	50	1	100	1	50	1	5.170

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

χ^2 calculada > χ^2 tablas

2) Pacientes

Se genotificaron 36 pacientes con genotipo CC, 13 CT y no se encontró ningún paciente homocigoto a la variante, a pesar de ello, las frecuencias genotípicas estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 13).

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
CC	36	0.73	85	0.87	36.86	0.75	0.020
CT	13	0.27			11.28	0.23	0.264
TT	0	0.00	13	0.13	0.86	0.02	0.862
Total	49	1	98	1	49	1	1.146*

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

* χ^2 calculada < χ^2 tablas

F) Genotipificación de la variante *HTR6*_rs1805054

El patrón de bandeo observado en los gels de agarosa correspondió al esperado, en la Figura 6 se muestra el patrón de bandeo específico para los genotipos CC, TT y CT, respectivamente.

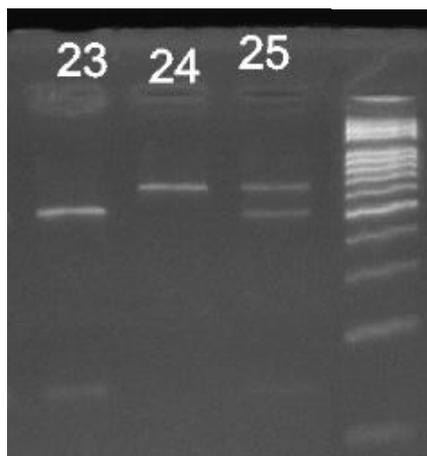


Figura 6. Imagen representativa con los genotipos de la variante *HTR6*_rs1805054. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de las muestras 23, 24, y 25 con genotipos CC, TT y CT, respectivamente. A la derecha, se muestra marcador de peso molecular de 50 pb (50 bp GeneRuler).

1) Controles

De las 50 muestras de controles sanos analizadas, 26 de ellas mostraron un genotipo homocigoto *wild type*, mientras que el resto (24) presentaron un estado heterocigoto de la variante, no se encontró ningún individuo homocigoto a la variante y debido a la variación entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperada, la muestra no estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 14).

Tabla 14. Genotipificación de la variante *HTR6_rs1805054* en el grupo control

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
CC	26	0.52	76	0.76	28.88	0.58	0.287
CT	24	0.48			18.24	0.36	1.819
TT	0	0	24	0.24	2.88	0.06	2.880
Total	50	1	100	1	50	1	4.986

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.
 χ^2 calculada > χ^2 tablas

2) Pacientes

Dentro del grupo de 49 pacientes se encontraron 14 sujetos con genotipo homocigoto *wild type*, mientras que 32 y 3 sujetos presentaron genotipos heterocigotos y homocigotos a la variante, respectivamente. Como se puede observar en la **Tabla 15**, las frecuencias encontradas no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 15. Genotipificación de la variante *HTR6_rs1805054* en el grupo de pacientes

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
CC	14	0.29	60	0.61	18.37	0.37	1.038
CT	32	0.65			23.27	0.47	3.279
TT	3	0.06	38	0.39	7.37	0.15	2.589
Total	49	1	98	1	49	1	6.907

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.
 χ^2 calculada > χ^2 tablas

G) Genotipificación de la variante *DRD2_rs1801028*

Debido a que se encontraron hasta 4 sitios de restricción, el patrón de bandeo de los amplicones digeridos presentó bandas adicionales, producto de la digestión incompleta de todos los fragmentos posibles, sin embargo, se lograron identificar cada uno de los genotipos de acuerdo a las bandas presentes en la región delimitada por las bandas de 100 y 150 pb, en la **Figura 7** se muestra el patrón de bandeo característico para los genotipos CC, CG y GG, respectivamente.

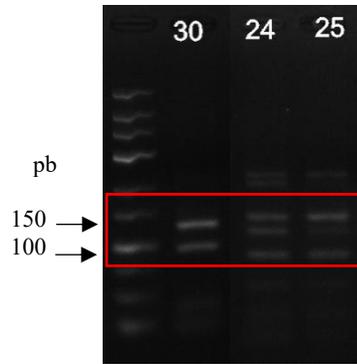


Figura. 7. Imagen representativa con los genotipos de la variante *DRD2*_rs1801028. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de las muestras 30, 24 y 25 con genotipos CC, CG y GG, respectivamente. A la izquierda, se muestra marcador de peso molecular de 25 pb (*GeneRuler Low Range DNA Ladder*) y en el rectángulo rojo se incluyen las bandas correspondientes de 100 y 150 pb.

1) Controles

Todos los controles presentaron genotipo heterocigoto para la variante *DRD2*_rs1801028 (Tabla 16), debido a la ausencia de individuos con genotipos homocigotos de ambos alelos, la muestra no estuvo en equilibrio.

Tabla 16. Genotipificación de la variante *DRD2*_rs1801028 en el grupo control

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
CC	0	0	50	0.5	12.50	0.25	12.500
CG	50	1			25.00	0.50	25.000
GG	0	0	50	0.5	12.50	0.25	12.500
Total	50	1	100	1	50	1	50.000

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

χ^2 calculada > χ^2 tablas

2) Pacientes

Se detectaron 25 pacientes con genotipo *wild type*, 23 heterocigotos y un solo paciente portador de la variante en estado homocigoto, las frecuencias genotípicas obtenidas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 17).

Tabla 17. Genotipificación de la variante *DRD2*_rs1801028 en el grupo de pacientes

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
CC	25	0.51	73	0.74	27.19	0.55	0.176
CG	23	0.47			18.62	0.38	1.029
GG	1	0.02	25	0.26	3.19	0.07	1.502
Total	49	1	98	1	49	1	2.708*

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

* χ^2 calculada < χ^2 tablas

H) Genotipificación de la variante *DRD2_rs1800497*

En la **Figura 8** se observan los patrones de bandeo correspondientes a los genotipos GG, GA y AA de 3 muestras control.

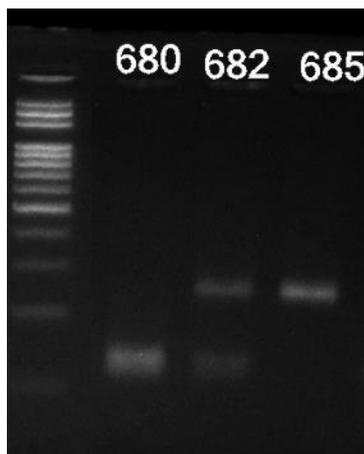


Figura 8. Imagen representativa con los genotipos de la variante *DRD2_rs1800497*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de las muestras 680, 682 y 685 con genotipos GG, GA y AA, respectivamente. A la derecha, se muestra marcador de peso molecular de 100 pb (Solis BioDyne® 100 pb DNA Ladder Ready to Load).

1) Controles

De los 50 controles analizados, 11 tuvieron genotipo homocigoto *wild type*, 24 heterocigotos y 15 homocigotos para el alelo alternativo, las frecuencias estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg (**Tabla 18**).

Tabla 18. Genotipificación de la variante *DRD2_rs1800497* en el grupo control

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
GG	11	0.22	46	0.46	10.58	0.21	0.017
GA	24	0.48			24.84	0.50	0.028
AA	15	0.3	54	0.54	14.58	0.29	0.012
Total	50	1	100	1	50	1	0.057*

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

* χ^2 calculada < χ^2 tablas

2) Pacientes

Las frecuencias genotípicas encontradas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, de las 49 muestras de pacientes analizadas, 15 presentan un genotipo *wild type*, 23 heterocigotos y 11 portadores homocigotos del alelo alternativo (véase **Tabla 19**).

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
GG	15	0.31	53	0.54	14.33	0.29	0.031
GA	23	0.47			24.34	0.50	0.073
AA	11	0.22	45	0.46	10.33	0.21	0.043
Total	49	1	98	1	49	1	0.148*

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

* χ^2 calculada < χ^2 tablas

I) Genotipificación de la variante *DRD3_rs6280*

Los resultados de este ensayo mostraron algunas bandas extra, producto de la digestión incompleta del amplicón, sin embargo, se hizo la genotipificación identificando dos bandas principales de 305 y 207 pb, con ayuda de las bandas del marcador de peso molecular correspondientes a 300 y 200 pb. A continuación, en la **Figura 9**, se muestran los patrones correspondientes a los genotipos CC, TT y CT, respectivamente

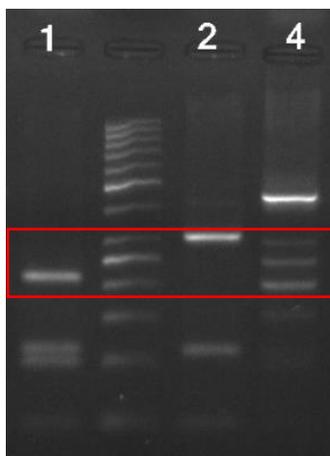


Figura 9. Imagen representativa con los genotipos de la variante *DRD3_rs6280*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de las muestras 1, 2 y 4 con genotipos CC, TT y CT, respectivamente. A la derecha, se muestra marcador de peso molecular de 50 pb (*50 bp GeneRuler*) y en el rectángulo rojo se incluyen las bandas correspondientes de 200, 250 y 300 pb.

1) Controles

Se encontraron 18 sujetos con un genotipo TT, 32 heterocigotos TC y ningún individuo con genotipo CC. En la **Tabla 20**, se observa que las frecuencias genotípicas obtenidas no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
TT	18	0.36	68	0.68	23.12	0.46	1.134
TC	32	0.64			21.76	0.44	4.819

CC	0	0	32	0.32	5.12	0.10	5.120
Total	50	1	100	1	50	1	11.073

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

χ^2 calculada > χ^2 tablas

2) Pacientes

En el caso de esta última variante, los amplicones de 6 muestras no mostraron signos de digestión a la hora de correr la electroforesis, por lo que la N, en este único caso, disminuyó a 43. De estos, 18 individuos presentan un genotipo TT, 22 uno TC y 3 corresponden al genotipo CC. Tal y como se resume en la **Tabla 21**, las frecuencias se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg

Tabla 21. Genotipificación de la variante DRD3_rs6280 en el grupo de pacientes

Genotipo	Observados				Esperado		$\frac{(N_{observada} - N_{esperada})^2}{N_{esperada}}$
	N	FG	N	FA	N	FG	
TT	18	0.42	58	0.67	19.56	0.45	0.124
TC	22	0.51			18.88	0.44	0.514
CC	3	0.07	28	0.33	4.56	0.11	0.533
Total	43	1	86	1	43	1	1.171*

FG: frecuencia genotípica, A: alelos, FA: frecuencia alélica.

* χ^2 calculada < χ^2 tablas

J) Clasificación de la respuesta en pacientes según la escala de Hamilton

Todos los pacientes fueron tratados con fluoxetina o amitriptilina, para su clasificación en no respondedores (NR), respondedores parciales (RP) y respondedores totales (RT) al tratamiento antidepressivo, se consideraron los datos de la escala de Hamilton de 30 de ellos, ya que no se contaban con los datos de la totalidad del grupo de pacientes, debido al abandono del seguimiento del estudio. La clasificación se hizo a partir del porcentaje de mejora, considerando un porcentaje de mejora mayor a 50% como RT,⁶ 25-50% como RP, y <25% como NR (**Tabla 22**).

Tabla 22. Características de los pacientes de acuerdo a su respuesta al tratamiento antidepressivo

Código de px	Puntaje en la escala de Hamilton		% de mejora	Clasificación = casos (%)	Edad (años ± DE)	Sexo (N, %)	Frecuencias genotípicas N (%)	Frecuencias alélicas N (%)
	Inicial	Final						

34	23	18	21.74				<p>HTR1A_rs6295 CG: 4 (100%)</p> <p>HTR2A_rs6311 AA: 2 (50%) GA: 1 (25%) GG: 1 (25%)</p> <p>HTR2A_rs6313 CC: 1(25%) CT: 1 (25%) TT: 2 (50%)</p> <p>HTR2A_rs6314 CC: 4 (100%)</p> <p>HTR6_rs180505 4 CC: 1 (25%) CT: 3 (75%)</p> <p>DRD2_rs180102 8 CC: 2 (50%) CG: 2 (50%)</p> <p>DRD2_rs180049 7 GG: 2 (50%) GA: 2 (50%)</p> <p>DRD3_rs6280 TT: 1 (25%) TC: 3 (75%)</p>	<p>C: 4 (50%), G: 4 (50%)</p> <p>A: 5 (62%) G: 3 (38%)</p> <p>C: 3 (38%) T: 5 (62%)</p> <p>C: 8 (100%)</p> <p>C: 5 (63%) T: 3 (37%)</p> <p>C: 6 (75%) G: 2 (25%)</p> <p>G: 6 (75%) A: 2 (25%)</p> <p>T: 5 (63%) C: 3 (37%)</p>
36	23	18	21.74					
37	27	22	18.52	NR = 4 (13.33%)	31.25 ± 9.43	F: 4 (100%)		
56	16	13	18.75					
11	24	13	45.83	RP = 6 (20%)	39.33 ± 17.48	F: 6 (100%)	<p>HTR1A_rs6295 CC:1 (17%) CG: 4 (66%) GG: 1 (17%)</p> <p>HTR2A_rs6311 AA: 1 (17%) GA: 3 (50%)</p>	<p>C: 6 (50%) G: 6 (50%)</p> <p>A: 5 (42%)</p>

20	29	15	48.28				GG: 2 (33%) HTR2A_rs6313 CC: 2 (33%) CT: 3 (50%) TT: 1 (17%)	G: 7 (58%)
							HTR2A_rs6314 CC: 5 (83%) CT: 1 (17%)	C:7 (58%) T: 5 842%)
35	23	17	26.09				HTR6_rs180505 4 CC: 3 (50%) CT: 3 (50%)	C: 11 (92%) T: 1 (8%)
							DRD2_rs180102 8 CC: 3 (50%) CG: 3 (50%)	C: 9 (75%) T: 3 (25%)
38	27	17	37.04				DRD2_rs180049 7 GG: 1 (17%) GA: 4 (66%) AA: 1 (17%)	C: 9 (75%) G: 3 (25%)
							DRD3_rs6280 TT: 2 (40%) TC: 3 (60%)	G: 6 (50%) A: 6 (50%)
51	30	16	46.67					
								T: 7 (70%) C: 3 (30%)
98	24	15	37.50					
2	23	4	82.61	RT = 20 (66.67%)	39.5± 10.32	F: 16 (80%) M: 4 (20%)	HTR1A_rs6295 CG: 13 (65%) CC: 5 (25%) GG: 2 (10%)	C: 23 (58%) G: 17 (42%)
4	14	4	71.43				HTR2A_rs6311 GA: 8 (40%) GG: 12 (60%)	
8	22	10	54.55					
10	15	5	66.67				HTR2A_rs6313	A: 8 (20%)

13	23	7	69.57			CC: 13 (65%) CT: 7 (35%)	G: 32 (80%)
19	21	10	52.38			HTR2A_rs6314 CC: 14 (70%) CT: 6 (30%)	
23	28	10	64.29				C: 33 (83%)
26	26	12	53.85			HTR6_rs180505 4 CC: 6 (30%) CT: 13 (65%) TT: 1 (5%)	T: 7 (17%)
28	15	7	53.33				
30	27	8	70.37			DRD2_rs180102 8 CC: 10 (50%) CG: 10 (50%)	C: 34 (85%) T: 6 (15%)
42	17	6	64.71				
46	18	5	72.22			DRD2_rs180049 7 GG: 7 (35%) GA: 7 (35%) AA: 6 (30%)	C: 25 (63%) T: 15 (37%)
53	20	4	80.00				
57	25	10	60.00			DRD3_rs6280 TT: 9 (47%) TC: 10 (53%)	
61	24	7	70.83				
62	16	4	75.00				C: 30 (75%) G:10 (25%)
70	22	5	77.27				
71	25	4	84.00				G: 21 (53%) A: 19 (47%)
90	20	7	65.00				
96	24	11	54.17				T: 28 (74%) C: 10 (26%)

Nota: **NR**= no respondedor, **RP**= respondedor parcial, **RT**= respondedor total, **DE**= desviación estándar

K) Análisis de resultados

1) Comparación entre pacientes y controles

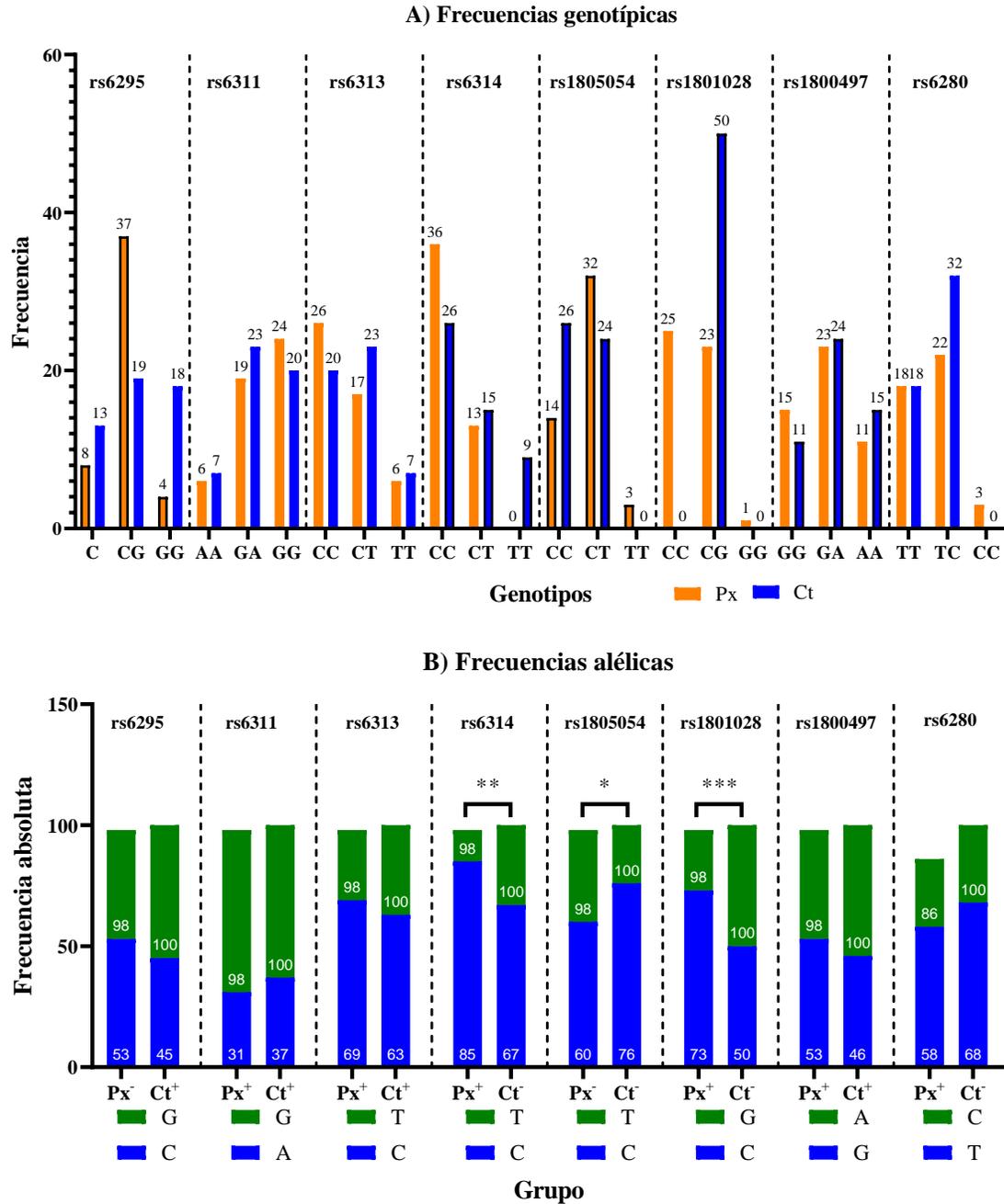


Figura 10. Gráficas con las frecuencias genotípicas (A), las barras de las frecuencias que no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg se encuentran delimitadas en color negro; y (B) frecuencias alélicas, se compararon entre pacientes (Px) y controles (Ct) con prueba exacta de Fisher. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$). Grupos en equilibrio de Hardy-Weinberg (+) y grupos en no equilibrio (-).

En la **Figura 10** se observan las frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas de pacientes y controles en el caso de tres variantes: *HTR2A*_rs6314, *HTR6*_rs1805054 y

DRD2_rs1801028, sin embargo, las frecuencias genotípicas en los controles para esas variantes no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que se compararon las frecuencias alélicas obtenidas en el grupo control con las frecuencias documentadas en el Proyecto de los 1000 Genomas, para una población residente en Los Ángeles con ascendencia mexicana (**Mxl**).

Otros conjuntos de datos que no estuvieron en equilibrio, fueron los de la variante *HTR1A_rs6295* en **Px** y de *DRD3_rs6280* para **Ct**. En el primer caso, al ser sujetos con una enfermedad no se espera que sus frecuencias genotípicas estén en equilibrio, sin embargo, en el último, al tratarse del grupo control contra el que se compararon los datos de **Px**, se esperaba que cumplieran con el equilibrio.

2) Comparación de controles con otras poblaciones

Con el objetivo de validar las frecuencias alélicas encontradas en este estudio, se tomaron como referencia las reportadas en el Proyecto de los 1000 Genomas para **Mxl**, estas frecuencias se encuentran en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Frecuencias alélicas reportadas para Mxl

Variante	Frecuencia alélica absoluta N (frecuencia relativa)
<i>HTR1A_rs6295</i>	C: 74 (0.578) G: 54 (0.422)
<i>HTR2A_rs6311</i>	G: 86 (0.672) A: 42 (0.328)
<i>HTR2A_rs6313</i>	C: 86 (0.672) T: 42 (0.328)
<i>HTR2A_rs6314</i>	C: 121 (0.945) T: 7 (0.055)
<i>HTR6_rs1805054</i>	C: 115 (0.898) T: 13 (0.102)
<i>DRD2_rs1801028</i>	C: 125 (0.977) G: 3 (0.023)
<i>DRD2_rs1800497</i>	G: 72 (0.562) A: 56 (0.438)
<i>DRD3_rs6280</i>	C: 43 (0.336) T: 85 (0.664)

Debido a la diferencia en el tamaño de las muestras, en la **Figura 11** se representan las frecuencias alélicas relativas (1:1000) de **Ct** y **Mxl**, así como la comparación entre ambos grupos con la prueba exacta de Fisher.

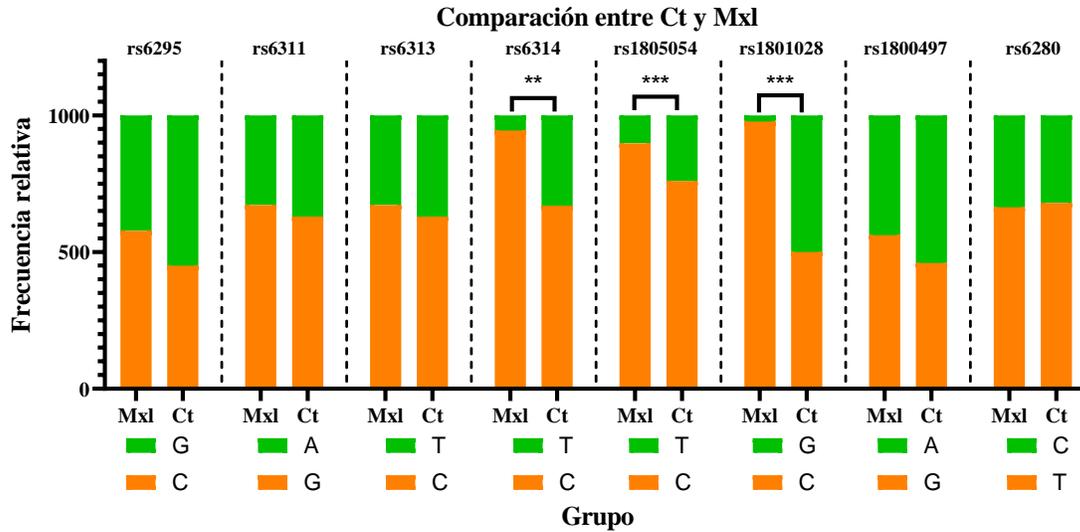


Figura 11. Gráfica de frecuencias alélicas relativas entre Ct y Mxl.
Prueba de Fisher *(p<0.05), **(p<0.01), ***(p<0.001)

No hubo diferencias estadísticas para cinco de las variantes estudiadas, sin embargo, las frecuencias alélicas de las variantes *HTR2A_rs6314*, *HTR6_rs1805054* y *DRD2_rs1801028* de Ct fueron distintas a las de Mxl, y no cumplieron con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto sugiere que los datos encontrados no son representativos de una muestra de la población mestiza mexicana, y por lo tanto las diferencias significativas encontradas con los pacientes no pueden ser reportadas, descartando así una asociación entre las variantes y el TDM.

Otro hallazgo importante es que los datos de Ct para la variante *DRD3_rs6280*, que no se encontraron en equilibrio, no fueron distintos a los encontrados en Mxl, por lo que se puede considerar que estos sí son representativos de una muestra de población mestiza mexicana.

Adicionalmente se compararon las frecuencias alélicas absolutas de Ct con las reportadas en población africana e ibérica, los resultados, en forma de frecuencias relativas, se observan en la **Figura 12**.

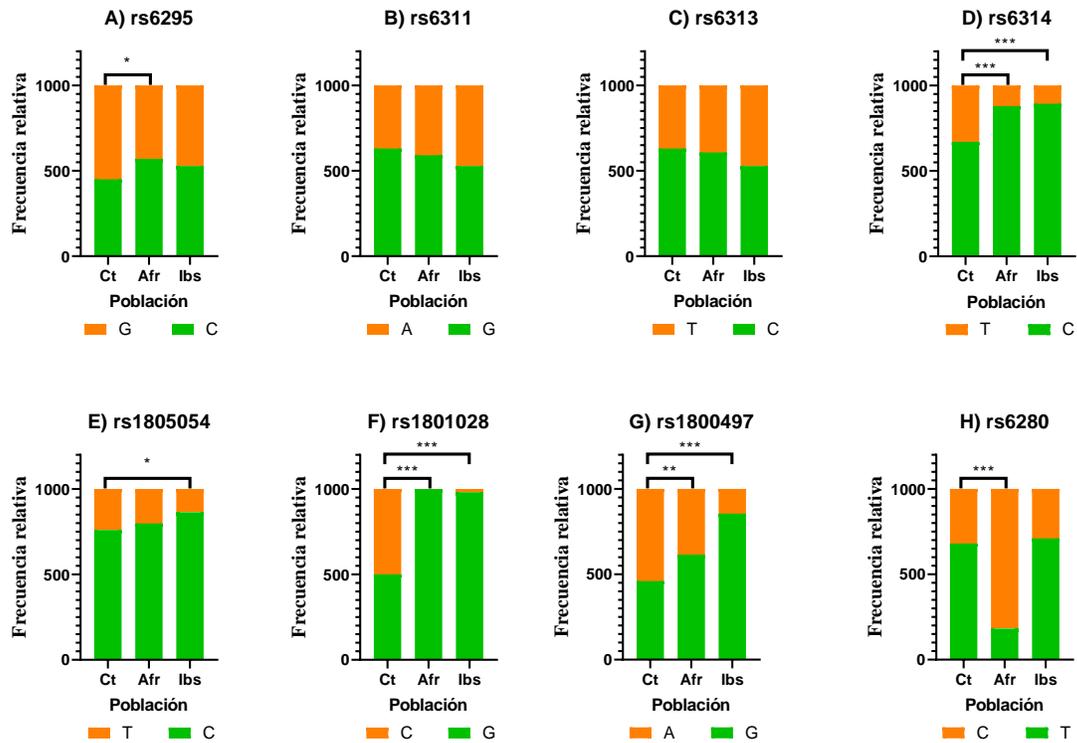


Figura 12. Comparación de frecuencias alélicas relativas de Ct con población africana e ibérica para cada una de las variantes (A-H), respectivamente. Prueba exacta de Fisher *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.0001$)

De la **Figura 12**, se puede concluir que hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Ct y la población africana en el caso de 5 variantes, dos de las cuales (*DRD2_rs1801028* y *HTR2A_rs6314*) no estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg y diferían también de Mx1. Por otro lado, con respecto a la población ibérica, se encontraron diferencias en 4 variantes, de las cuales, 3 fueron las que diferían totalmente de Mx1 (*HTR2A_rs6314*, *HTR6_rs1805054* y *DRD2_rs1801028*). Los datos anteriores demuestran que existen diferencias interétnicas con la población africana en las variantes *HTR1A_rs6295*, *DRD2_rs1800497* y *DRD3_rs6280*. De la misma manera, se encontraron diferencias con la población ibérica en el caso específico de la variante *DRD2_rs1800497*.

3) Comparación de pacientes según la respuesta al tratamiento farmacológico

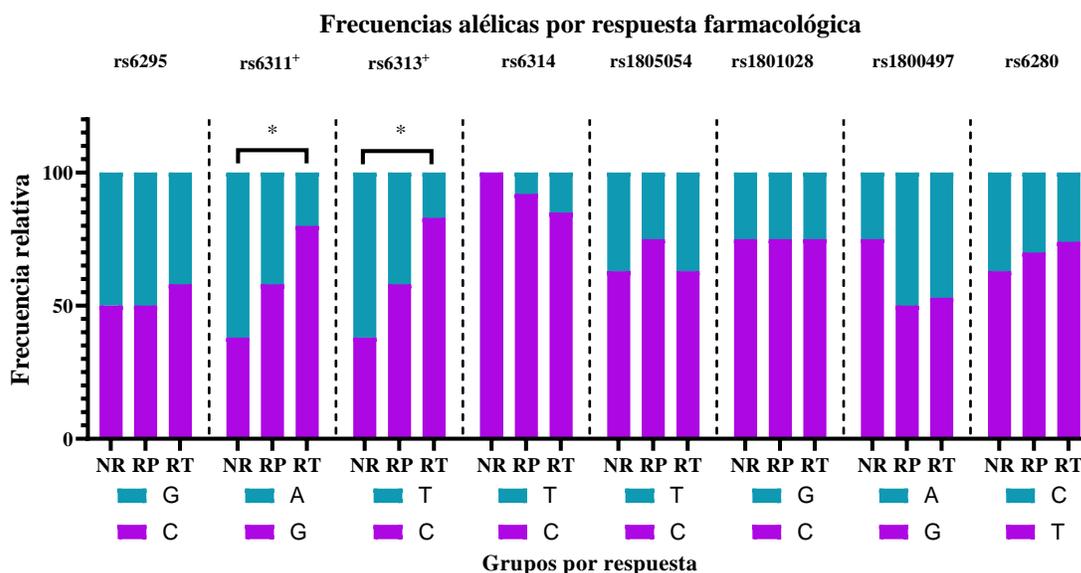


Figura 13. Comparación de las frecuencias relativas entre los grupos de respuesta.
Prueba de χ^2 [†]($p < 0.05$)
Prueba de Fisher *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$)

En la **Figura 13** se muestran las frecuencias relativas (1:100) de cada uno de los alelos en los 3 subgrupos según la respuesta farmacológica. Un primer análisis de χ^2 demostró que existían diferencias significativas entre los 3 subgrupos para las variantes *HTR2A_rs6311* y *HTR2A_rs6314*, posteriormente se parearon y analizaron cada uno de los 3 subgrupos con la prueba exacta de Fisher para encontrar los subgrupos específicos donde se encontraba la diferencia, y en ambos casos, esta diferencia se encontró entre NR y RT. El cálculo de OR demostró la asociación del alelo A de la variante *HTR2A_rs6311* con la resistencia farmacológica (OR=6.667, CI₉₅=1.228-27.96, $p=0.0252$). El alelo alternativo T de la variante *HTR2A_rs6314* también mostró estar asociado con la farmacorresistencia (OR=7.857, CI₉₅=1.399-33.24, $p=0.0166$).

Adicionalmente, se hizo un análisis considerando a los RP y RT como un sólo grupo, el cual presentó mejoras en sus síntomas depresivos (mejora mayor a 25%, RP+RT), los resultados tanto de esta comparación binomial, como de la anterior de tres grupos se resumen en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Distintas comparaciones entre grupos por respuesta farmacológica

Variante	Comparación			OR, CI ₉₅
<i>HTR2A_rs6311</i>	NR	RP	RT	Para la comparación NR vs RT (6.67*, 1.228 -27.96)
	NR+RP		RT	4*, 1.182 - 12.47
	NR	RP+RT		5*, 1.037 - 20.29
<i>HTR2A_rs6313</i>	NR	RP	RT	Para la comparación NR vs RT (7.86*,

			1.399-33.24)
	NR+RP	RT	4.7*, 1.338 - 16.15
	NR	RP+RT	5.6*, 1.137 - 22.60

Notas: **NR**= no respondedor, **RP**= respondedor parcial, **RT**= respondedor total, **CI₉₅**= intervalo de confianza al 95%. *(p<0.05).

Los datos de la **Tabla 24** demuestran que la asociación entre las variantes y la respuesta farmacológica se mantiene independientemente de si se define la respuesta como una mejora mayor a 25 o 50%. Además, se observa también que los portadores de las variantes tienen 5 y 5.6 veces menor probabilidad, respectivamente, de presentar alguna mejora durante su tratamiento (>25% de mejora), mientras que la probabilidad de presentar remisión (mejora >50%) disminuye de 7-8 veces.

Para conocer si había diferencia en la respuesta farmacológica a nivel de genotipo se realizó una comparación de estos en las 2 variantes de interés, primero se compararon los 3 genotipos por subgrupo de respuesta con una prueba de χ^2 , para posteriormente encontrar, con ayuda de la prueba exacta de Fisher, los genotipos específicos con mayor efecto sobre la respuesta farmacológica, los resultados se muestran en la **Figura 14**.

Efecto del genotipo en la respuesta farmacológica

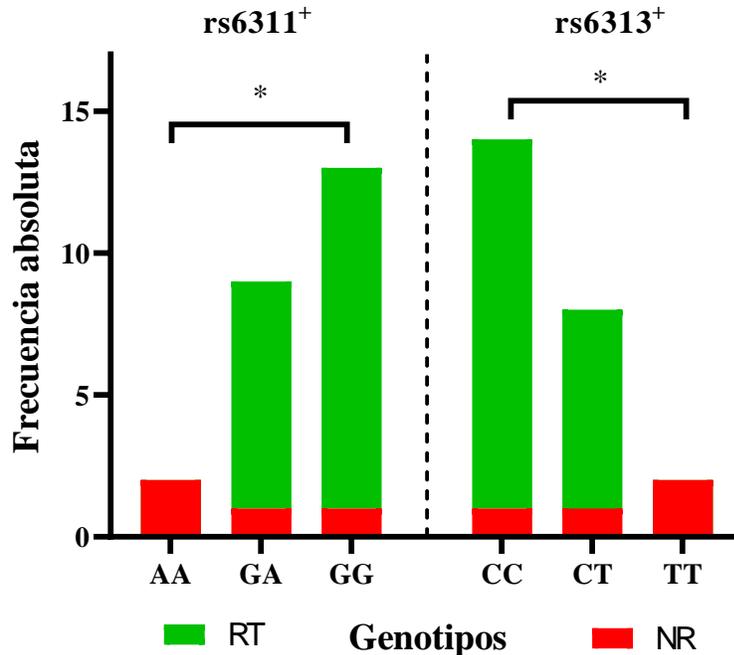


Figura 14. Efecto del genotipo en la respuesta farmacológica.
Prueba de χ^2 *(p<0.05)
Prueba de Fisher *(p<0.05)

Los resultados mostrados en la **Figura 14** confirman el efecto de las dos variantes sobre la respuesta farmacológica en pacientes con TDM, dicho efecto está presente solamente cuando los pacientes son portadores homocigotos de la variante *HTR2A_rs6311* ($p=0.0286$) y *HTR2A_rs6313* ($p=0.0250$), el tamaño del efecto (OR) no pudo ser calculado debido al tamaño de la muestra, sin embargo, estos hallazgos coinciden con lo reportado en la literatura acerca de la asociación entre la variante *HTR2A_rs6311* en estado homocigoto y la respuesta farmacológica.²²

De acuerdo con la literatura, estas 2 variantes en las que se encontró un efecto, están en desequilibrio de ligamiento.¹⁹ Por ello, y para descartar el efecto de otras variables como el sexo, edad y tiempo de tratamiento, se realizó un análisis multivariado con el programa R, considerando la clasificación trinomial (NR, RP y RT) de la respuesta farmacológica, los resultados se observan en la **Figura 15**.

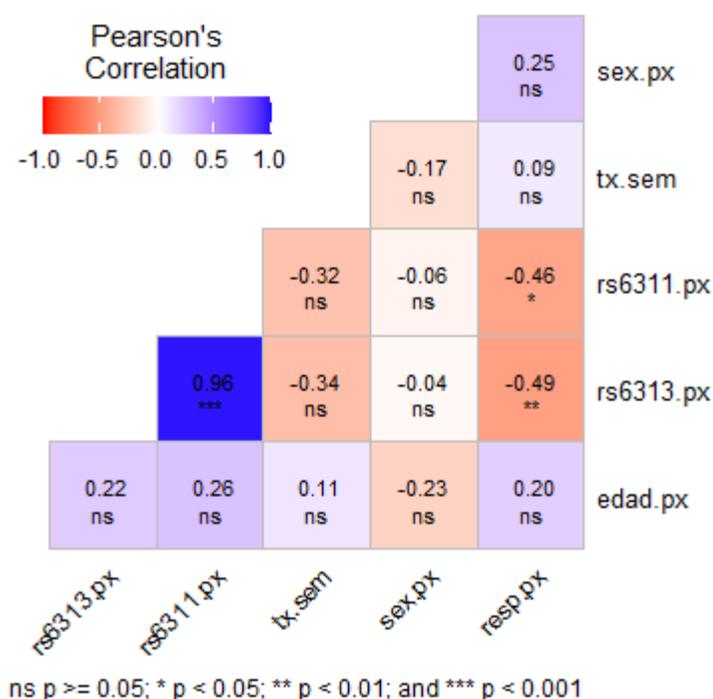


Figura 15. Mapa de calor del análisis multivariado considerando distintas variables. **rs6313.px**= Genotipos de *HTR2A_rs6313* en **Px**, **rs6311.px**= Genotipos de *HTR2A_rs6311* en **Px**, **tx.sem**= tiempo de tratamiento en semanas, **sex.px**= sexo, **resp.px**= clasificación de Px según respuesta farmacológica, **edad.px**=edad.

Los resultados de la **Figura 15** descartan que el efecto observado se deba a otras covariables, a la vez que confirman que existe una fuerte correlación entre las dos variantes genéticas ($p<0.001$), lo cual es un indicativo que las variantes pueden estar en desequilibrio de ligamiento dentro de las muestras analizadas, sin embargo, harían falta otro tipo de análisis para confirmarlo.

Los datos anteriores sugieren entonces, que el efecto negativo observado sobre la respuesta farmacológica puede no deberse a los efectos individuales de cada una de las dos variantes, sino más bien al resultado global de estas, en el cual pueden estar implicados mecanismos de

regulación específica, como la unión de factores de transcripción, aparición o desaparición de secuencias potenciadoras,^{20,21} así como mecanismos epigenéticos relacionados a la metilación de la región promotora de *HTR2A*.²⁴ En este último caso, sería interesante corroborar si existe una metilación diferencial y si esta, está asociada o no a una de las dos variantes para tener una mejor comprensión de cómo los mecanismos epigenéticos pueden también modificar la respuesta farmacológica al igual que las variantes FGX.

L) Conclusiones

Se identificaron las variantes genéticas (*HTR1A*_rs6295, *HTR2A*_rs6311, *HTR2A*_rs6313, *HTR2A*_rs6314, *HTR6*_rs1805054, *DRD2*_rs1801028, *DRD2*_rs1800497 y *DRD3*_rs6280) en pacientes mexicanos con TDM.

No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre pacientes y controles, este resultado indica que tanto los pacientes como los controles pertenecen a la misma población. Con respecto a otras poblaciones, se encontraron diferencias interétnicas entre la población mestiza mexicana y las poblaciones africanas e ibéricas.

Se determinó el impacto de las variantes genéticas *HTR2A*_rs6311 y *HTR2A*_rs6313 sobre la respuesta al tratamiento antidepresivo en pacientes con TDM, encontrándose que dichas variantes en estado homocigoto predisponen a una falla terapéutica con fluoxetina y amitriptilina (OR 6.77 y 7.86, respectivamente). Sin embargo, esto no descarta que las otras 6 variantes tengan algún tipo de impacto en el TDM, pero se necesitan más estudios con un mayor tamaño de muestra para tener resultados concluyentes.

Esos hallazgos aportan información farmacogenómica relevante para el tratamiento con fluoxetina y amitriptilina de pacientes con TDM. Futuros estudios deberán de considerar un mayor tamaño de muestra para descartar la asociación de las demás variantes, además de investigar más a fondo sobre los mecanismos relacionados con las dos variantes con efectos significativos.

VIII. Referencias bibliográficas

1. Coryell W. Trastornos depresivos. Manual MSD versión para profesionales. Accessed July 17, 2024. <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-psiqui%C3%A1tricos/trastornos-del-estado-de-%C3%A1nimo/trastornos-depresivos>
2. Liu J, Liu Y, Ma W, Tong Y, Zheng J. Temporal and spatial trend analysis of all-cause depression burden based on Global Burden of Disease (GBD) 2019 study. *Sci Rep.* 2024;14(1):12346. Published 2024 May 29. doi:10.1038/s41598-024-62381-9
3. Depresión mayor. Medlineplus.gov. Accessed July 17, 2024. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000945.htm>
4. American Psychiatric Association. Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM-5.2014. Acceso 16 de julio 2024. <https://www.eafit.edu.co/ninos/reddelaspreguntas/Documents/dsm-v-guia-consulta-manual-diagnostico-estadistico-trastornos-mentales.pdf>

5. University of Florida. Hamilton Depression Rating Scale (HDRC). 2011. Acceso 17 de julio de 2024. <https://dcf.psychiatry.ufl.edu/files/2011/05/HAMILTON-DEPRESSION.pdf>
6. Ching-Hua, Cheng-Chung, Fu-Chiang y Hsien-Yuan. Percentage reduction of depression severity versus absolute severity after initial weeks of treatment to predict final response or remission. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2013; 67:265-272. doi:10.1111/pcn.12046
7. Cui L, Li S, Wang S, et al. Major depressive disorder: hypothesis, mechanism, prevention and treatment. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):30. Published 2024 Feb 9. doi:10.1038/s41392-024-01738-y
8. Willner P, Scheel-Krüger J, Belzung C. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(10 Pt 1):2331-2371. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.12.007
9. Barlati S, Minelli A, Nibbio G, et al. The role of pharmacogenetics in the treatment of major depressive disorder: a critical review. *Front Psychiatry*. 2023;14:1307473. Published 2023 Nov 10. doi:10.3389/fpsy.2023.1307473
10. Secretaría de Salud. 2º Diagnóstico Operativo de Salud Mental y Adicciones. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. 2022. Acceso 2 de marzo 2023. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/730678/SAP-DxSMA-Informe-2022-rev07jun2022.pdf>
11. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Resultados de la Primera Encuesta Nacional de Bienestar Autorreportado (Enbiare) 2021. Comunicado De Prensa Núm. 772/21, 14 De Diciembre De 2021. Acceso 2 de marzo 2023. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/ENBIARE_2021.pdf
12. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Día Mundial para la Prevención del Suicidio (Datos Nacionales). Comunicado de Prensa Núm. 542/23, 8 De Septiembre De 2023. Acceso 21 de julio de 2023. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_Suicidio23.pdf
13. Peñas-Lledó EM, Trejo HD, Dorado P, et al. CYP2D6 ultrarapid metabolism and early dropout from fluoxetine or amitriptyline monotherapy treatment in major depressive patients. *Mol Psychiatry*. 2013;18(1):8-9. doi:10.1038/mp.2012.91
14. Albert PR, Le François B, Vahid-Ansari F. Genetic, epigenetic and posttranscriptional mechanisms for treatment of major depression: the 5-HT1A receptor gene as a paradigm. *J Psychiatry Neurosci*. 2019;44(3):164-176. doi:10.1503/jpn.180209
15. Kautzky A, James GM, Philippe C, et al. The influence of the rs6295 gene polymorphism on serotonin-1A receptor distribution investigated with PET in patients with major depression applying machine learning. *Transl Psychiatry*. 2017; 7(6): e1150. Published 2017 Jun 13. doi:10.1038/tp.2017.108
16. Gadow KD, Smith RM, Pinsonneault JK. Serotonin 2A receptor gene (HTR2A) regulatory variants: possible association with severity of depression symptoms in

- children with autism spectrum disorder. *Cogn Behav Neurol*. 2014;27(2):107-116. doi:10.1097/WNN.0000000000000028
17. Wan YS, Zhai XJ, Tan HA, Ai YS, Zhao LB. Associations between the 1438A/G, 102T/C, and rs7997012G/A polymorphisms of HTR2A and the safety and efficacy of antidepressants in depression: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J*. 2021;21(2):200-215. doi:10.1038/s41397-020-00197-2
 18. Kao CF, Kuo PH, Yu YW, et al. Gene-Based Association Analysis Suggests Association of HTR2A With Antidepressant Treatment Response in Depressed Patients. *Front Pharmacol*. 2020; 11:559601. Published 2020 Dec 3. doi:10.3389/fphar.2020.559601
 19. Smith RM, Papp AC, Webb A, et al. Multiple regulatory variants modulate expression of 5-hydroxytryptamine 2A receptors in human cortex. *Biol Psychiatry*. 2013;73(6):546-554. doi:10.1016/j.biopsych.2012.09.028
 20. Smith AK, Dimulescu I, Falkenberg VR, et al. Genetic evaluation of the serotonergic system in chronic fatigue syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(2):188-197. doi: 10.1016/j.psyneuen.2007.11.001
 21. Parsons MJ, D'Souza UM, Arranz MJ, Kerwin RW, Makoff AJ. The -1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity. *Biol Psychiatry*. 2004;56(6):406-410. doi: 10.1016/j.biopsych.2004.06.020
 22. Wan YS, Zhai XJ, Tan HA, Ai YS, Zhao LB. Associations between the 1438A/G, 102T/C, and rs7997012G/A polymorphisms of HTR2A and the safety and efficacy of antidepressants in depression: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J*. 2021;21(2):200-215. doi:10.1038/s41397-020-00197-2
 23. Niitsu T, Fabbri C, Bentini F, Serretti A. Pharmacogenetics in major depression: a comprehensive meta-analysis [published correction appears in *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013 Dec 2; 47:118-9]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; 45:183-194. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.05.011
 24. Cheah SY, Lawford BR, Young RM, Morris CP, Voisey J. mRNA Expression and DNA Methylation Analysis of Serotonin Receptor 2A (HTR2A) in the Human Schizophrenic Brain. *Genes (Basel)*. 2017;8(1):14. Published 2017 Jan 4. doi:10.3390/genes8010014
 25. Minov C, Baghai TC, Schüle C, et al. Serotonin-2A-receptor and -transporter polymorphisms: lack of association in patients with major depression. *Neurosci Lett*. 2001;303(2):119-122. doi:10.1016/s0304-3940(01)01704-9
 26. Fukuo Y, Kishi T, Yoshimura R, et al. Serotonin 6 receptor gene and mood disorders: case-control study and meta-analysis. *Neurosci Res*. 2010;67(3):250-255. doi: 10.1016/j.neures.2010.04.003
 27. Illi A, Setälä-Soikkeli E, Viikki M, et al. 5-HTR1A, 5-HTR2A, 5-HTR6, TPH1 and TPH2 polymorphisms and major depression. *Neuroreport*. 2009;20(12):1125-1128. doi:10.1097/WNR.0b013e32832eb708
 28. Kishi T, Fukuo Y, Yoshimura R, et al. Pharmacogenetic study of serotonin 6 receptor gene with antidepressant response in major depressive disorder in the

- Japanese population. *Hum Psychopharmacol*. 2010;25(6):481-486.
doi:10.1002/hup.1142
29. Lee SH, Lee KJ, Lee HJ, Ham BJ, Ryu SH, Lee MS. Association between the 5-HT6 receptor C267T polymorphism and response to antidepressant treatment in major depressive disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2005;59(2):140-145.
doi:10.1111/j.1440-1819.2005.01348.x
 30. Zhao F, Cheng Z, Piao J, Cui R, Li B. Dopamine Receptors: Is It Possible to Become a Therapeutic Target for Depression?. *Front Pharmacol*. 2022; 13:947785. Published 2022 Aug 17. doi:10.3389/fphar.2022.947785
 31. Glatt SJ, Jönsson EG. The Cys allele of the DRD2 Ser311Cys polymorphism has a dominant effect on risk for schizophrenia: evidence from fixed- and random-effects meta-analyses. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141B(2):149-154.
doi:10.1002/ajmg.b.30273
 32. Lane HY, Lee CC, Chang YC, Lu CT, Huang CH, Chang WH. Effects of dopamine D2 receptor Ser311Cys polymorphism and clinical factors on risperidone efficacy for positive and negative symptoms and social function. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004;7(4):461-470. doi:10.1017/S1461145704004389
 33. Porcelli S, Drago A, Fabbri C, Gibiino S, Calati R, Serretti A. Pharmacogenetics of antidepressant response. *J Psychiatry Neurosci*. 2011;36(2):87-113.
doi:10.1503/jpn.100059
 34. Pohjalainen T, Rinne JO, Nägren K, et al. The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry*. 1998;3(3):256-260. doi:10.1038/sj.mp.4000350
 35. Hayden EP, Klein DN, Dougherty LR, et al. The dopamine D2 receptor gene and depressive and anxious symptoms in childhood: associations and evidence for gene-environment correlation and gene-environment interaction. *Psychiatr Genet*. 2010;20(6):304-310. doi:10.1097/YPG.0b013e32833adccb
 36. Hill SY, Jones BL, Haas GL. Suicidal ideation and aggression in childhood, genetic variation and young adult depression. *J Affect Disord*. 2020;276:954-962.
doi:10.1016/j.jad.2020.07.049
 37. Moraga-Amaro R, Gonzalez H, Pacheco R, Stehberg J. Dopamine receptor D3 deficiency results in chronic depression and anxiety. *Behav Brain Res*. 2014;274:186-193. doi:10.1016/j.bbr.2014.07.055
 38. Zhi Y, Yuan Y, Si Q, et al. The Association between DRD3 Ser9Gly Polymorphism and Depression Severity in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis*. 2019;2019:1642087. Published 2019 Apr 15. doi:10.1155/2019/1642087
 39. Light KJ, Joyce PR, Luty SE, et al. Preliminary evidence for an association between a dopamine D3 receptor gene variant and obsessive-compulsive personality disorder in patients with major depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141B(4):409-413. doi:10.1002/ajmg.b.30308
 40. Tsuchimine S, Yasui-Furukori N, Nakagami T, Sato Y, Kaneko S. DRD3, but not BDNF, genotype affects treatment response to paroxetine in major depressive

- disorder: a preliminary study. *J Clin Psychopharmacol*. 2012;32(5):724-726. doi:10.1097/JCP.0b013e318267b6da
41. ThermoFisher. How TaqMan SNP Genotyping Assays Work. Acceso 22 de julio 2024. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/genotyping-analysis-real-time-pcr-information/how-taqman-snp-genotyping-assays-work.html>
 42. Caws M, Tho DQ, Duy PM, et al. PCR-restriction fragment length polymorphism for rapid, low-cost identification of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):1789-1793. doi:10.1128/JCM.01960-06
 43. National Human Genome Research Institute. Enzimas de restricción. 24 de julio de 2024. Acceso 24 de julio de 2024. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Enzima-de-restriccion#:~:text=Una%20enzima%20de%20restricci%C3%B3n%20es,secuencia%20conocida%20en%20cada%20extremo>.
 44. Ates O, Karakus N, Sezer S, Bozkurt N. Genetic association of 5-HT1A and 5-HT1B gene polymorphisms with migraine in a Turkish population. *J Neurol Sci*. 2013;326(1-2):64-67. doi:10.1016/j.jns.2013.01.013
 45. Lebe, Moritza; Hasenbring, Monika I.a.; Schmieder, Kirstenb; Jetschke, Kathleenc; Harders, Albrechtc; Epplen, Jörg T.d; Hoffjan, Sabined; Kötting, Judithd. Association of serotonin-1A and -2A receptor promoter polymorphisms with depressive symptoms, functional recovery, and pain in patients 6 months after lumbar disc surgery. *Pain*; 2013; 154(3):p 377-384. | DOI: 10.1016/j.pain.2012.11.017
 46. Sujitha SP, Nair A, Banerjee M, et al. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) 2A receptor gene polymorphism is associated with schizophrenia. *Indian J Med Res*. 2014;140(6):736-743.
 47. Ghasemi A, Seifi M, Baybordi F, Danaei N, Samadi Rad B. Association between serotonin 2A receptor genetic variations, stressful life events and suicide. *Gene*. 2018;658:191-197. doi:10.1016/j.gene.2018.03.023
 48. Laika B. Pharmacogenetic screening of psychiatric inpatients: Associations between clinical outcome and selected polymorphisms in drug metabolism, drug transport and drug target structures. *Technische Universität München*; 2009. Acceso 25 de julio de 2023. <https://mediatum.ub.tum.de/doc/679094/document.pdf>
 49. Arinami T, Itokawa M, Enguchi H, et al. Association of dopamine D2 receptor molecular variant with schizophrenia. *Lancet*. 1994;343(8899):703-704. doi:10.1016/s0140-6736(94)91581-4
 50. Aliasghari F, Nazm SA, Yasari S, Mahdavi R, Bonyadi M. Associations of the ANKK1 and DRD2 gene polymorphisms with overweight, obesity and hedonic hunger among women from the Northwest of Iran. *Eat Weight Disord*. 2021;26(1):305-312. doi:10.1007/s40519-020-00851-5
 51. Han J, Li Y, Wang X. Potential link between genetic polymorphisms of catechol-O-methyltransferase and dopamine receptors and treatment efficacy of risperidone on

schizophrenia. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017; 13:2935-2943. Published 2017 Dec 5. doi:10.2147/NDT.S148824

52. Tarach, P. Application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) in the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Acta Universitatis Lodzianis. Folia Biologica et Oecologica*; 2021/17. doi: 10.18778/1730-2366.16.14