

Polimorfismos en el promotor del gen transportador de la 5-hidroxitriptamina asociado al Trastorno Depresivo Mayor; estudio sobre frecuencia alélica en la Comarca Lagunera

Polymorphisms in the 5-hydroxytryptamine transporter promoter gene associated to Mayor Depression Disorder: a study of allelic frequency in the Comarca Lagunera region



<https://www.inverse.com/article/43724-depression-genetics-heritability-80-new-genes>

Adria Imelda Prieto-Hinojosa^{a,b*}, Ana Laura Astorga Sifuentes^a, Alejandra Méndez Hernández^c, Luis Emilio Vázquez Maya^a, Miguel Hassan Gidi Bañuelos^{a,b}, Faviel Francisco González Galarza^a, Rafael Argüello Astorga^{a,c}

^a Centro de Investigación Biomédica, Universidad Autónoma de Coahuila.

^b Tecnológico de Monterrey, Campus Laguna.

^c Instituto de Ciencia y Medicina Genómica, Torreón, Coahuila.

* **Autor de correspondencia:** Adria Imelda Prieto Hinojosa.
adprietoh@uadec.edu.mx

RESUMEN

El trastorno depresivo mayor (TDM) es una enfermedad compleja, vinculándose con múltiples elementos que contribuyen a su aparición como aspectos psico-sociales, genética del individuo, componentes ambientales, entre otros. Existen reportes que relacionan la aparición del TDM con factores fisiopatológicos y genéticos, esto incluye una disfunción en el neurotransmisor serotonina (5-HT), el cual es regulado por el transportador de serotonina (5-HTTLPR). El gen que codifica para dicho transportador de serotonina se denomina *5HTT* (o *SLC6A4*). Se han identificado dos variantes en la región promotora del gen que se asocian con la regulación de éste; el alelo "S" (alelo corto) y el alelo "L" (alelo largo). La relevancia de este polimorfismo reside en la respuesta efectiva al tratamiento, por lo cual, este estudio aporta datos de interés como posible biomarcador de respuesta al tratamiento antidepresivo como los inhibidores de la recaptura de serotonina (ISRS) en nuestra población. Mediante técnicas de PCR se logró caracterizar la frecuencia alélica y genotípica del gen *SLC6A4* en una muestra de 187 individuos sanos no relacionados de la región de la Comarca Lagunera.

Palabras clave: 5-HTTLPR, serotonina, Trastorno Depresivo Mayor, Comarca Lagunera.

Abstract

Major depressive disorder (MDD) is a complex disease, linked with multiple elements that contribute to its appearance as psychosocial aspects, genetics of the individual, environmental components among others. Some reports correlate the occurrence of MDD with pathophysiological and genetic factors, this includes a dysfunction in the neurotransmitter serotonin (5-HT), which is regulated by the serotonin transporter (5-HTTLPR). The gene that encodes for this serotonin transporter is called *5HTT* (or *SLC6A4*). Two variants for this gene have been identified in the promoter region of the gene that are associated with its regulation, the "S" allele (short allele) and the "L" allele (long allele). The relevance of this polymorphism lies in the effective response to treatment, that is the reason why this study may provide data for a potential biomarker for patients treated with serotonin recapture inhibitor (SSRIs) in our population. Using PCR techniques, it was possible to characterize the allelic and genotypic frequency of the *SLC6A4* gene in a sample of 187 unrelated healthy individuals from the Comarca Lagunera Region.

INTRODUCCIÓN

El trastorno depresivo mayor (TDM) comprende un conjunto complejo de síntomas que pueden llegar a imposibilitar a un individuo. Entre los síntomas característicos se encuentran los sentimientos de tristeza, vacío, desesperanza, irritabilidad o frustración, una notable pérdida de interés u obtención de placer en actividades regulares, perturbaciones del sueño, fatiga, falta de energía, alteraciones del apetito y cambios en el peso, ansiedad, agitación, pensamientos o movimientos lentos, sentimiento de culpa, fijación por errores cometidos, en algunos casos pensamientos recurrentes relativos al suicidio, así como problemas físicos con frecuencia inexplicables como dolores de cabeza y espalda (Mayo Clinic, 2020). De acuerdo al Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales en su quinta versión (DSM-V), para que un individuo pueda ser diagnosticado con TDM se requiere la presencia de cinco o más síntomas durante por lo menos dos semanas consecutivas. En el mundo existen alrededor de 350 millones de personas diagnosticadas con TDM. Por su parte, en América Latina y el Caribe la prevalencia es de ~5% (OMS, 2012).

La depresión presenta retos inconmensurables en diversos sentidos en el paciente. Por un lado, los complejos circunstanciales sociales que rodean al individuo, que denotan la relación del ser con los demás resultan en factores endógenos que, de una u otra manera, afectan el estado anímico del paciente (Rosenquis y cols., 2011). Por otro lado, pueden existir aspectos estructurales neurofisiológicos que establezcan una proclividad del individuo a desarrollar TDM (Whittle, y cols., 2014). Aunado a lo anterior, aspectos relacionados como el género pueden resultar de importancia en el desarrollo de TDM (Rafull y cols., 2012).

Actualmente, se reconoce que mediante el estudio de factores genéticos y neurobiológicos se puede aproximar a comprender mejor la etiología, la respuesta a tratamientos farmacológicos y el pronóstico del TDM. En cuanto a la genética del TDM, estudios de asociación derivados de genoma completo (GWAS) han intentado encontrar *loci* que estén significativamente relacionados con el TDM. Recientemente, un meta-análisis identificó 102 variantes genéticas y el papel que juega las regiones cerebrales prefrontales en la depresión (Howard y cols., 2019). Uno de los genes asociados es el gen *SLC6A4* que codifica para el transportador de serotonina (5-HTTLPR). Este gen se encuentra en la posición 17q11.2, comprende alrededor de 40 Kb y se compone de 14 exones (Smiths y cols., 2004). El papel biológico de este transportador está en relación con la recaptura de serotonina desde el espacio presináptico para su reutilización.

Dentro del 5-HTTLPR existe una inserción/delección de 44 pares de bases en la región promotora del gen, que da lugar a dos variantes, el alelo “L” y el alelo “S”, ambos con diferencias funcionales. El alelo “L” del promotor del 5-HTTLPR posee una capacidad aproximadamente tres veces mayor para recapturar la serotonina (5-HT) extracelular (Lesch y cols., 1996), mientras que el alelo “S” tiene menor actividad transcripcional, por lo tanto, menor expresión del receptor y menor actividad funcional (Drtilkova y cols., 2010). Así mismo, es importante mencionar que dentro de los promotores con la variante “L”, existe una subclasificación caracterizada por el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs25531 en el que una adenina (A) es sustituida por una guanina (G). Este cambio crea un posible sitio de unión para un factor de transcripción, la AP2 (activating enhancer-binding protein 2).

El AP2 es un inhibidor de la transcripción que se une a la secuencia si la sustitución G está presente. Por lo tanto, la presencia del alelo “S”, o bien, la presencia del alelo largo y la sustitución A→G, “L_G” (rs25531) pueden reducir la tasa de transcripción del gen 5-HTTLPR en tejido neuronal (Meyer y cols., 2016) (Haberstick y cols., 2015). Por su parte, aquellos individuos poseedores del alelo “L_A” del 5-HTTLPR tienen una mayor tasa de transcripción por consiguiente una mayor recaptura de 5-HT. En contraste, el alelo “L_G” y el alelo “S” han sido asociados a una menor recaptura de 5-HT. El resultado de lo anterior es extremadamente complejo de traducir a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), sin embargo, varios autores han encontrado que los portadores de alelo “L” tienen una mejor y más rápida respuesta al tratamiento con inhibidores de la recaptura de serotonina (ISRS), lo que implicaría un mejor pronóstico, sin embargo, los resultados no han sido concluyentes y son difíciles de interpretar debido a la baja frecuencia del alelo “L” en diferentes poblaciones.

El presente análisis pretende determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de una muestra de individuos sanos no relacionados de la región de la Comarca Lagunera del gen 5-HTTLPR, para comprender la distribución poblacional de estos polimorfismos y la relevancia que esto tendría en el contexto clínico y de la respuesta al tratamiento del TDM en nuestra región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Este trabajo de investigación incluyó una muestra de 187 individuos sanos (104 mujeres y 83 hombres mayores de 18 años) pertenecientes a la región de la Comarca Lagunera compuesta por 16 municipios de los estados de Coahuila y Durango para el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen transportador de serotonina 5-HTTLPR.

Genotipificación

Se obtuvo una muestra de 5 mililitros de sangre periférica en tubos con EDTA al vacío por punción venosa de cada participante. La extracción de ADN se realizó utilizando el método CTAB/DTAB. Posteriormente, se estandarizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para el polimorfismo 5-HTTLPR de acuerdo con el protocolo descrito por Heils y colaboradores (Heils y cols., 1996). Se utilizaron los primers con las siguientes secuencias : primer sentido 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3' y el primer antisentido 5'-GGGGGACTGAGCTGGACAACCCAC-3'. La reacción fue estandarizada con las siguientes condiciones: 8µL de la siguiente solución; 10mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 5% de dimetil sulfóxido, 1.5mM de dNTPs, 0.5ul de primer sentido, 0.5µL de primer antisentido, 12.75µL de agua, 0.25µL de Taq polimerasa y 3 µL de ADN (100 nanogramos aproximadamente), para un volumen total de 25µL por tubo. La reacción se llevó a cabo en 35 ciclos, cada uno con las siguientes características: 30 segundos de desnaturalización a 95°C, hibridación a 61°C por 30 segundos y extensión a 72°C por un minuto. Una vez estandarizada la técnica se procedió al estudio de todas las muestras. Se sometieron los productos de PCR a electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), a 45mV por 5 horas para lograr una separación adecuada de las bandas. Las bandas esperadas de electroforesis fueron de 484 pares de bases y de 528 pares de bases, se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pares de bases para identificar los amplicones correspondientes a los alelos "S" y "L" respectivamente. Como control interno se utilizó beta-globina. Se utilizaron como controles positivos muestras heterocigotas ("LS") y homocigotas ("LL", "SS") para los dos polimorfismos y en todos los casos se incluyeron controles negativos. Adicionalmente, se realizó la genotipificación de 35 individuos para la determinación del SNP rs25531 mediante secuenciación de nueva generación, para la identificación de variantes del alelo L.

Análisis estadístico

El cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas se realizó por conteo directo. Adicionalmente, se realizó la prueba de Hardy-Weinberg para determinar si las variantes se encontraban en equilibrio, utilizando un valor $p < 0.05$ para demostrar la significancia estadística. Los cálculos se realizaron mediante el software PyPop (Lancaster y cols., 2003).

RESULTADOS

Las frecuencias alélicas y genotípicas se muestran en la Tabla 1. De acuerdo con estos resultados, el porcentaje de individuos con el alelo 'L', que indica una mayor captura de serotonina, fue de 57%, mientras que el alelo 'S' mostró un porcentaje de 43%. Adicionalmente, como se observa en esta tabla, sólo el SNP rs25531 cumplió con la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 1. Frecuencias alélicas y genotípicas del transportador 5-HTTLPR y SNP rs25531 en individuos de la Comarca Lagunera.

| Gen / Polimorfismo | Frecuencia genotípica (n=187) | | | Frecuencia alélica | |
|--------------------|-------------------------------|-------|-------|--------------------|------|
| | L/L | L/S | S/S | L | S |
| 5-HTTLPR | 0.241 | 0.412 | 0.348 | 0.57 | 0.43 |
| | HWE: p=0.022 | | | | |
| rs25531 | 0.942 | 0.057 | 0 | 0.97 | 0.03 |
| | HWE: p=0.861 | | | | |

HWE: Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Dado que la presencia del alelo A del SNP rs25531 ha sido reportada como importante para determinar la recaptura de 5-HT, se realizó un análisis descriptivo de las combinaciones entre los alelos presentes en el transportador 5-HTTLPR y el SNP rs25531. Como se observa en la Tabla 2, alrededor del 46% de los individuos presentaron la combinación L/L-AA, la cual ha sido asociada con una mayor recaptura de 5-HT.

Tabla 2. Asociación del polimorfismo del transportador 5-HTTLPR y alelos del SNP rs25531.

| Haplotipo 5-HTTLPR / rs25531 | Frecuencia (n=35) |
|------------------------------|-------------------|
| L/L-AA | 0.46 |
| L/S-AA | 0.06 |
| L/S-AG | 0.26 |
| S/S-AA | 0.23 |

DISCUSIÓN

De acuerdo con la literatura la concentración extracelular de serotonina es un factor fundamental en el diagnóstico y pronóstico del TDM, misma que a su vez puede estar potencialmente relacionada con el polimorfismo 5-HTTLPR. Derivado de esto, el propósito de este estudio fue analizar la frecuencia de los alelos "L" y "S" del gen 5-HTTLPR en la región de la Comarca Lagunera en razón a la limitada literatura existente hasta el momento en nuestra región y la relevancia que implicaría en la detección temprana de casos de individuos con TDM. Con base en lo anterior, se plantea la posibilidad de personalizar el tratamiento de acuerdo con el perfil genético de cada individuo. Dada la limitada información sobre la frecuencia del polimorfismo en nuestra región, la idea inicial es obtener resultados poblacionales.

En este estudio se lograron determinar las frecuencias alélicas y genotípicas en el transportador de serotonina (5-HTTLPR) en 187 individuos sanos no relacionados,

además de determinar la frecuencia del SNP rs25531 que afecta la funcionalidad del alelo "L", encontrado los siguientes resultados: la frecuencia del alelo "L" del gen 5-HTTLPR en individuos de la Comarca Lagunera fue del 57%, siendo mayor que la reportada en un estudio realizado por Sarmiento y cols., la cual fue del 49% en sujetos sanos. Es importante resaltar que, en dicho estudio, la frecuencia del alelo "L" en individuos con TDM fue del 37%, es decir, que aquellos individuos con menor frecuencia del alelo "L" presentaron mayor probabilidad de presentar TDM (Sarmiento-Hernández y cols., 2019) (Pérez-Maturo y cols., 2017). Por otro lado, la frecuencia del SNP rs25531 sólo se realizó en 35 individuos, de los cuales ya se había realizado la genotipificación del gen 5-HTTLPR, en ellos los resultados muestran que el alelo "LA", asociado a una mejor recaptura, se encontró solamente en el 46% de los individuos, lo cual sugiere que aun poseyendo el alelo "L" algunos individuos no responderían adecuadamente a los tratamientos con inhibidores de la recaptura de serotonina.

Lo anterior tiene particular importancia ya que en un futuro podría desarrollarse una prueba molecular farmacogenética que permita estratificar los individuos diagnosticados con TDM para identificar el mejor tratamiento posible, ya que aquellos pacientes con variantes que no responden a los tratamientos de encuentran representadas en la población general. Con los resultados obtenidos en este estudio se podría deducir que, en comparación con otras poblaciones, los afectados por TDM en nuestra región tendrían mayor posibilidad de responder a un tratamiento con inhibidores de la recaptura de serotonina (ISRS).

Referencias bibliográficas

Artículos Científicos

- Drtilkova, I, M Neumannova, P Theiner, A Filova, J Lochman, L Castulik, and O Sery. 2010. "The VNTR Polymorphism of the Serotonin Transporter Gene Predisposes Czech Boys to Hyperkinetic Disorders." *Activitas Nervosa Superior Redviva* 157-162.
- Haberstick, B C, A Smolen, R B Williams, G D Bishop, V A Foshee, T P Thornberry, and K M Harris. 2015. "Population frequencies of the Triallelic 5HTTLPR in Six Ethnically Diverse Samples from North America, Southeast Asia, and Africa." *Behaviour Genetics* 255-61.
- Heils, A, A Teufel, S Petri, G Stöber, P Riederer, D Bengel, and K P Lesch. 1996. "Allelic variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression." *Journal of Neurochemistry* 2621-4.
- Howard, D M, M J Adams, T K Clarke, J D Hafferty, J Gibson, M Shirali, J R Coleman, et al. 2019. "Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions." *Nature Neuroscience* 343-352.

- Lancaster, A, M P Nelson, D Meyer, R M Single, and G Thomson. 2003. "PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data." *Pac Symp Biocomputer* 515-525.
- Lesch, K P, D Bengel, A Heils, S Z Sabol, B D Greenberg, S Petri, C R Müller, D H Hammer, and D L Murphy. 1996. "Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region." *Science* 1527-31.
- Meyer, B, CB T Nguyen, A Moen, E Fagermoen, D Sulheim, H Nilsen, V B Wyller, and J Gjerstad. 2016. "Maintenance of Chronic Fatigue Syndrome (CFS) in Young CFS Patients Is Associated with the 5-HTTLPR and SNP rs25531 A > G Genotype." *PLoS One* e0140883.
- Perez-Maturo, J, Y Videla, V Di Geronimo, and S Quintana. 2017. "Serotonergic polymorphisms: allelic and genotypic frequency distribution in the Mar del Plata, Argentina, population and comparison of genotyping methods." *Journal of Basic and Applied Genetics* 51-50.
- Rafful, C, M E Medina-Mora, G Borges, C Benjet, and R Orozco. 2012. "Depression, gender and the treatment gap in Mexico." *Journal of Affective Disorders* 165-9.
- Rosenquist, J N, J H Fowler, and N A Christakis. 2011. "Social network determinants of depression." *Molecular Psychiatry* 273-281.
- Sarmiento-Hernandez, E I, R E Ulloa-Flores, B Camarena-Medellin, M A Sanabrais-Jimenez, A Aguilar-Garcia, and S Hernandez-Muñoz. 2019. "Association between 5-HTTLPR polymorphism, suicide attempt and comorbidity in Mexican adolescents with major depressive disorder." *Actas Esp Psiquiatria* 1-6.
- Smiths, K M, L JM Smiths, JS AG Schouten, F F Stelma, P Nelemans, and M H Prins. 2004. "Influence of SERTPR and STin2 in the serotonin transporter gene on the effect of selective serotonin reuptake inhibitors in depression; a systematic review." *Molecular Psychiatry* 433-41.
- Whittle, S, R Lichter, M Dennison, N Vijayakumar, O Schwartz, M L Byrne, J G Simmons, et al. 2014. "Structural brain development and depression onset during adolescence: A prospective longitudinal study." *The American Journal of Psychiatry* 564-571.

Sitios, páginas y libros electrónicos

- Organización Mundial de la Salud. 2012. *Día Mundial de la Salud Mental: la depresión es.* Octubre 9. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7305:20-12-dia-mundial-salud-mental-depresion-trastorno-mental-mas-frecuente&Itemid=1926&lang=es. Fecha de consulta: 22 de enero 2019
- Mayo Clinic. 2020. *Depression (Major depressive disorder) - Symptoms and causes.* Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/depression/symptoms-causes/syc-20356007?p=1>. Fecha de consulta: 20 Febrero 2020.