



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE NEUROGENÉTICA

DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DE OXITOCINA Y EL GEN
DEL RECEPTOR DE OXITOCINA EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE
ESQUIZOFRENIA REFRACTARIA EN TRATAMIENTO CON CLOZAPINA

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

PATRICIO NICOLÁS GONZÁLEZ NAVARRO

Director de Tesis: Dr. Pablo Moya Vera

2017

Agradecimientos

La realización de esta tesis ha sido posible gracias al financiamiento otorgado por el Proyecto ICM-MINECOM NC130011, Núcleo Milenio NuMIND, en el cual, el director de esta tesis, Dr. Pablo Moya, es Director Alterno.

Agradecimientos a Alexandra Elbakyan por crear Sci-Hub, la página de donde descargué casi un 80% de los papers que utilicé en esta tesis.

A todos ustedes, las personas que conocí en este largo camino, les quiero decir que me siento muy afortunado de que el azar nos haya juntado, que hayan sido ustedes las personas que ya estaban en la Universidad o en el laboratorio cuando llegué o que llegaron después que yo. Y agradecido de todo el amor y confianza compartidos en amistades, conversaciones y buenos y malos momentos.

Afortunado y agradecido de todas las personas que conocí en “MoyaLab” -que ya son casi como mi otra familia- partiendo por mi director de tesis, Pablo Moya, y en especial a Marisol, Isa, Cote, Fran y René.

Afortunado y agradecido de los amigos y compañeros que conocí en el transcurso de la carrera, en especial, a Yasmín, la mejor amiga que pude haber tenido. Y a Xavi, Óscar, Vicky, Nico, David, Niccole, Carlos, Fabo, Manu, Seba, Ale, Naty, Dani, Claudia, Carrasco.

Mención aparte merece CEFUV 2014, Cote, Chachi, Tita, Rositas, gracias por tantas risas, tonteras y el trabajo que hicimos juntos.

Afortunado y agradecido de mis amigos del Coro UV, Naty, Pablo, Renzo, Benja, Paula y Belu.

Y, por supuesto, afortunado y agradecido de mi familia, mis papás Luchy y Pato, y mis hermanas Vale y Bárbara, por todo.

Resumen

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico grave e incapacitante, caracterizado por un conjunto de desórdenes mentales que incluyen alucinaciones, alteraciones en el afecto, en la conducta, juicio de las emociones y problemas cognitivos como atención y concentración. Uno de los principales tratamientos farmacológicos incluye a la clozapina. Sin embargo, existe un porcentaje de pacientes que no responden a ella. Estudios reportan que la presencia de polimorfismos de nucleótido simple podría condicionar la respuesta a tratamiento, y dentro de éstos estarían involucrados los genes de la oxitocina y su receptor. A la fecha, no existen estudios publicados en población chilena que den cuenta de la posible relación entre polimorfismos de oxitocina y su receptor con la etiología de esquizofrenia. La presente tesis evaluó la frecuencia de los polimorfismos de nucleótido único rs877172, rs274010, rs2740204 en el gen de oxitocina y rs2254298, rs53576, rs2228485 en el gen del receptor de oxitocina en un grupo de individuos con diagnóstico de esquizofrenia refractaria. Se compararon frecuencias entre pacientes respondedores y no respondedores a tratamiento con clozapina. Se encontraron asociaciones significativas en la distribución alélica del SNP rs53576, y en las distribuciones genotípicas de rs53576 y rs877172 en los pacientes resistentes. Para los otros polimorfismos no hay diferencias significativas entre los grupos. Estos resultados sugieren que la presencia de estos polimorfismos podría influir en la respuesta al tratamiento con clozapina.

Polymorphisms determination in oxytocin gene and oxytocin receptor gene in patients with refractory schizophrenia diagnosis in clozapine treatment.

Schizophrenia is a serious and incapacitating psychiatric disorder, characterized by a combination of mental disorders that included hallucinations, affection alterations, behavior changes, emotional judgment and cognitive process like attention and concentration. One of the main pharmacological treatments includes clozapine. However, exist a percentage of patients that does not respond to treatment. Evidence suggests the presence of Single Nucleotide Polymorphisms can modify the treatment outcome, and among these, the oxytocin and oxytocin receptor genes could be involved. Up to date, there are not published studies of the Chilean population that reports the possible relation between oxytocin and oxytocin receptor polymorphisms with the etiology of the schizophrenia. In this thesis, the frequency of different Single Nucleotides Polymorphisms was assessed, including the rs877172, rs2740210, rs2740204 in the oxytocin gene and the rs2254298, rs53576, rs2228485 in oxytocin receptor gene in a population of individuals diagnosed with refractory schizophrenia. Frequencies of Polymorphisms were compared between patients that respond or not to the treatment with clozapine. Significant associations were found in the allelic distribution of rs53576 SNP, and in the genotypic distribution of rs53576 and rs877172 of non-responder treatment patients. In the other polymorphisms are not significant difference among groups. These results suggest that the presence of these polymorphism could modify clozapine treatment outcome.

Índice

Introducción	1
1. Esquizofrenia	1
2. Oxitocina	4
3. Rol de la OXT en esquizofrenia	4
4. Justificación del estudio	6
Hipótesis	8
Objetivos	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Pacientes y métodos	10
Pacientes	10
Extracción de ADN	10
Cuantificación del ADN	11
PCR (discriminación alélica)	11
Análisis estadístico	12
Resultados	14
Caracterización de pacientes	14
Gráficos de PCR	15
Distribución de frecuencias alélicas	17
Distribución de frecuencias genotípicas	19
Discusión	21
Conclusiones	25
Bibliografía	26
Anexos	31
Anexo 1: Genotipos de pacientes	31

Introducción

1. Esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico grave e incapacitante, caracterizado por un conjunto de desórdenes mentales como alteraciones de la percepción (alucinaciones), ideación, comprobación de la realidad (delirios) procesos del pensamiento (asociaciones laxas), sentimientos (afecto plano, afecto inapropiado), conducta (catatonia, desorganización), cognición (atención, concentración), motivación y juicio de las emociones. Éstas comprometen las funciones esenciales que dan a la persona normal la vivencia de su individualidad, singularidad y dominio de sí misma. Por lo tanto, de esta manera, suelen afectar de forma importante la vida de quienes la padecen y así como la de personas de su círculo cercano, tanto familiares como amigos. No hay ningún síntoma que, por sí solo, sea patognómico de la esquizofrenia. No todos los síntomas descritos están presentes en cada uno de los pacientes de esquizofrenia. El trastorno se caracteriza por una gran heterogeneidad entre los distintos individuos y una variabilidad en cada uno de ellos a lo largo del tiempo (1).

En un meta análisis que revisó estudios publicados entre 1965 y 2002 de 46 países de los cinco continentes, se obtuvo una prevalencia de vida de 4,0 personas por cada mil habitantes (2). En otro meta análisis, realizado por el mismo grupo de investigadores, se llevó a cabo una revisión de estudios desde 1965 hasta 2001 en 33 países, que determinó una incidencia de 15,2 casos nuevos por cada 100.000 habitantes por año. Junto con esto, el estudio mostró que existe una mayor incidencia de esquizofrenia en hombres que en mujeres, mayor en zonas urbanas que rurales, y mayor en inmigrantes (africanos, indios, polacos, rusos, afrocaribeños y otros asiáticos) que en personas nativas (Alemania, Reino Unido, Suecia, Países Bajos) (3).

En Chile, la prevalencia de la esquizofrenia es de 1,4 a 1,6 personas por cada mil habitantes, y la incidencia es de 12 casos nuevos por cada 100.000 habitantes por

año (4). En el Estudio Chileno de Prevalencia de Patología Psiquiátrica, llevado a cabo el 2002, se mostró una prevalencia de vida de 0,9% (5).

Entre un 20-40% de los pacientes experimenta sus primeros episodios psicóticos antes de los 20 años de edad. Para los hombres, la edad *peak* de inicio se encuentra entre los 15-25 años, mientras que en las mujeres está entre los 25-35 años. Las mujeres, además, presentan un segundo *peak* de inicio, después de los 40-45 años, justo antes de la menopausia (1).

Los síntomas característicos de la esquizofrenia son usualmente clasificados en cuatro grandes grupos (ver Tabla 1): síntomas positivos, en los que existe un exceso o distorsión en la percepción de la realidad, así como pensamientos y conductas desorganizadas; síntomas negativos, definidos como la ausencia o disminución de las funciones normales; síntomas cognitivos, que afectan deficitariamente múltiples áreas de la cognición; y síntomas afectivos y ansiosos, relacionados con el estado de ánimo y las reacciones del paciente a ciertos estímulos (6).

El tratamiento de la esquizofrenia, de manera general, incluye evaluación integral, farmacoterapia, intervenciones psicosociales, intervenciones de rehabilitación neurocognitiva y servicios de apoyo (4). En la terapia farmacológica, los antipsicóticos constituyen la primera línea de tratamiento, los cuales, en su mayoría, actúan sobre el sistema dopaminérgico a nivel central (1). Sin embargo, hay un porcentaje de pacientes, entre 10-30%, que tiene poca o nula respuesta farmacológica, y otro 30% que tiene una respuesta parcial (1). En estos casos de resistencia al tratamiento, se recomienda aumentar dosis, sustituir o agregar antipsicóticos (7, 8). La indicación que se ha mostrado más eficiente es el inicio de tratamiento con clozapina (9). Sin embargo, sólo un 30-60% de los pacientes resistentes responden adecuadamente al fármaco (10).

Tabla 1. Clasificación de síntomas de la esquizofrenia (modificado de Minsal 2017).

Síntomas positivos	Síntomas negativos
Ideas delirantes, alucinaciones, catatonía, agitación.	Aplanamiento afectivo, retraimiento emocional, retraimiento social, apatía, falta de espontaneidad, pensamiento estereotipado, alogia, abolición, anhedonia.
Síntomas cognitivos	Síntomas afectivos y ansiosos
Déficits en atención, memoria, procesamiento de información, funciones ejecutivas (problemas para estructurar una meta, concentrarse, priorizar, ordenar, evaluar, adaptarse); pobreza ideativa.	Disforia (irritabilidad, preocupación, tensión), humor depresivo, desesperanza, ideas e intentos de suicidio, hostilidad, impulsividad.

La clozapina es un antipsicótico atípico, utilizado en los casos en que no hay una respuesta adecuada del paciente a dos o más antipsicóticos, e indicado además para diagnosticados con esquizofrenia asociada a comportamientos suicidas o conductas autolesivas (6). Mejora los síntomas negativos y algunos aspectos cognitivos (fluidez verbal, recuerdo inmediato y diferido) (11). Su mecanismo de acción difiere de los antipsicóticos típicos en el bloqueo dopaminérgico, donde hay una menor unión a receptores D2 y mayor unión a los receptores D4, lo que le confiere una disminución en los efectos laterales de tipo extrapiramidales. Además, posee afinidad por receptores serotoninérgicos, muscarínicos, alfa-adrenérgicos e histaminérgicos (10).

2. Oxitocina

La oxitocina (OXT) es una hormona polipeptídica de nueve aminoácidos. Es sintetizada principalmente en neuronas hipotalámicas en los núcleos supraópticos (SON) y paraventricular (PVN). Aunque también en tejidos periféricos, tales como útero, placenta, saco amniótico, cuerpo lúteo, testículos y corazón (12). El gen de la OXT se encuentra en el brazo corto del cromosoma 20, región 1, banda 3 (20p13), el cual codifica un precursor que luego de ser procesado genera oxitocina y neurofisisina I (13). Tiene un largo de 760 pares de base (bp) y posee tres exones. (15).

Por otro lado, el receptor de oxitocina (OXTR) es una proteína de 389 aminoácidos con siete dominios transmembrana que corresponde a una proteína G_q , la cual activa la vía de señalización de fosfolipasa C (PLC) (12). Su gen se ubica en el brazo corto del cromosoma 3, región 2, banda 5, sub-banda 3 (3p25.3); tiene un largo de 17 kilobases, y está constituido por tres intrones y cuatro exones (13).

La OXT estimula la contracción del músculo uterino durante el parto y en la eyección de la leche durante la lactancia en respuesta a la succión del bebé al pezón. La OXT también está involucrada en diversos comportamientos sociales, tales como el sexual, el maternal, memoria social, reconocimiento social, comportamiento afiliativo, apego; y comportamientos “no sociales” como aprendizaje, memoria, memoria espacial y no espacial (16).

3. Rol de la OXT en esquizofrenia

Como ha sido descrito en la literatura, entre las características distintivas que se observan en los pacientes con esquizofrenia se destacan las dificultades en el desarrollo de las habilidades sociales, que incluyen la comunicación y la mantención de relaciones interpersonales con otros individuos (17, 18, 19). Asimismo, se ha observado que estas características se presentan antes del inicio de los brotes psicóticos, e inclusive han sido reportados en parientes de los pacientes esquizofrénicos (20). Estudios en humanos han arrojado interesantes

resultados en lo que respecta al papel que juega la OXT en la conducta social, potenciando la codificación y, en consecuencia, el recuerdo de estímulos sociales positivos (21, 22).

Hay estudios que plantean que la fisiopatología de la esquizofrenia podría estar relacionada a alteraciones en el sistema oxitocinérgico (23, 24, 25). Goldman y cols. detectaron una relación entre los niveles plasmáticos de OXT en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia y su desempeño en el reconocimiento de emociones faciales, capacidad que está disminuida en esquizofrenia (26). Además, se ha mostrado que pacientes diagnosticados con esquizofrenia con niveles elevados de OXT plasmática presentan síntomas positivos menos severos y menos déficits sociales (23).

Por otra parte, se ha observado que en modelos de ratones deficientes (knockout, KO) de OXT existen déficits en funciones cognitivas y sociales (27). Los animales machos fallaron en desarrollar memoria social tanto en el test de habituación-deshabitación (28) y el test de reconocimiento social (29). La administración de un antagonista de OXT (AOVT) suprimió el reconocimiento social en hembras (30).

Se ha descrito que la presencia de polimorfismos de nucleótido único (SNP, *single nucleotide polymorphism*) en los genes de OXT y OXTR tendría implicancia en la severidad de los síntomas y eficacia del tratamiento en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia (24, 31).

Dentro del campo específico del estudio genético en cognición social, el gen OXTR ha sido probablemente el más estudiado, siendo relacionado con su funcionamiento tanto en adultos sanos, como en pacientes con trastornos psiquiátricos como esquizofrenia (32, 33). Las variantes rs53576 y rs2254298 han sido asociadas tanto a medidas de autorreporte de empatía como a datos de neuroimágenes funcionales en pruebas de percepción de emociones (34). Además, se ha descrito que quienes presentan SNPs en OXTR mejoran los

síntomas positivos luego del tratamiento con antipsicóticos (24), lo cual podría deberse a que la clozapina aumentaría los niveles plasmáticos de OXT (35).

Dada la relación entre los síntomas negativos en esquizofrenia y los efectos de OXT en comportamientos sociales, es que los investigadores plantean que una desregulación del sistema oxitocinérgico podría contribuir a la etiología y sintomatología de la esquizofrenia (36).

4. Justificación del estudio

En la actualidad, existe una alta tasa de pacientes refractarios a la farmacoterapia disponible para el tratamiento de la esquizofrenia (antipsicóticos), los cuales bordean el 30%, incluso después del uso de clozapina, fármaco recomendado por la guía clínica AUGÉ del Minsal como terapia refractaria (6).

Uno de los problemas que presenta el tratamiento con clozapina, es la heterogeneidad de resultados en los pacientes, presentando una alta variabilidad de respuesta farmacológica entre ellos (9, 10), derivando en complicaciones de la no predictibilidad de la respuesta terapéutica y, por ende, la necesidad de equilibrar sus beneficios con sus potenciales efectos adversos.

Existen aún muchas interrogantes en lo que respecta al tratamiento farmacológico de la esquizofrenia, especialmente a nivel local. Es por esto que resulta esencial llevar a cabo estudios genéticos dentro de la población chilena que sirvan como predictor de la eficacia al tratamiento con clozapina.

Además, existen evidencias sólidas que apuntan a la OXT como una alternativa viable en el tratamiento de la sintomatología esquizofrénica (27, 36, 37); junto con reportes de asociación para variantes en los genes que codifican para OXT y OXTR, en la etiología de la esquizofrenia (24, 31, 33).

Por lo que, teniendo en cuenta esta problemática, se hace necesaria la realización de un estudio genético que evalúe las diferencias en la frecuencia de SNPs de los

genes que codifican para OXT y OXTR entre pacientes que responden al tratamiento con clozapina y pacientes que no responden a dicho fármaco.

Hipótesis

Las frecuencias de polimorfismos en el gen de oxitocina (rs877172, rs2740210, rs2740204) y en el gen de receptor de oxitocina (rs2254298, rs53576, rs2228485) son distintas entre pacientes con diagnóstico de esquizofrenia refractaria respondedores al tratamiento con clozapina comparados con aquellos que no responden al tratamiento.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la frecuencia de los SNPs rs877172, rs2740210, rs2740204 en el gen de OXT, y los SNPs rs2228485, rs53576, rs2254298 en el gen OXTR en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia refractaria.

Objetivos específicos

- Genotipificar un grupo de pacientes con diagnóstico de esquizofrenia refractaria para los polimorfismos rs877172, rs2740210, rs2740204 en el gen de OXT, y rs2228485, rs53576, rs2254298 en el gen OXTR, por PCR en tiempo real con sondas Taqman.
- Determinar frecuencias alélicas y genotípicas de los distintos SNPs estudiados y evaluarlas estadísticamente.
- Analizar correlaciones entre las variables de polimorfismos y respuesta a tratamiento con clozapina.

Pacientes y métodos

Pacientes

Este trabajo se enmarca en el proyecto colaborativo del tutor de esta tesis con el Dr. Álvaro Cavieres del Hospital Psiquiátrico El Salvador, Playa Ancha. Se trabajó con un panel de ADN de individuos con diagnóstico de esquizofrenia refractaria, bajo tratamiento con clozapina, obtenido a partir de muestras de sangre recolectadas durante el 2015 y 2016. El estudio cuenta con la aprobación del comité de ética para la Investigación en Salud del Servicio de Salud Valparaíso-San Antonio.

- Criterios de inclusión: Pacientes atendidos en el Hospital Psiquiátrico, menores de 60 años, con diagnóstico sólo de esquizofrenia refractaria, en tratamiento con clozapina desde hace más de un mes, y haber firmado consentimiento informado.
- Criterios de exclusión: Capacidad cognitiva que le impida firmar el consentimiento informado, decidir abandonar el estudio, cambiar de tratamiento antes de tomar las muestras.

Extracción de ADN

El ADN requerido para ser analizado se obtiene a partir de muestras de donantes. Para esto se utilizó el kit de extracción NucleoSpin®Blood L (Macherey-Nagel). Se pipetea 2mL de las muestras de sangre y 150µL de proteinasa K en un tubo falcon de 15mL, luego se agregan 2mL de buffer BQ1 a las muestras y se vortexean vigorosamente por 10 segundos. Incubar muestras a 56°C por 15 minutos. Agregar 2mL de etanol (96-100%) a cada muestra y mezclar por inversión 10 veces. Para cada preparación, tomar una columna NucleoSpin®Blood L y ponerla en un tubo colector de 15mL y cargar 3mL del lisado (No humedecer la orilla de la columna). Cerrar los tubos con tapa y centrifugar a 4500 x g por 3 minutos. Cargar el lisado restante en la columna NucleoSpin®Blood L respectiva para la muestra, evitando humedecer la orilla. Centrifugar a 4500 x g por 5

minutos. Descartar el sobrenadante y poner la columna de vuelta en el tubo colector. Para el primer lavado, agregar 2mL de buffer BQ2 y centrifugar a 4500 x g por 2 minutos. Para el segundo lavado y secado, agregar 2mL de buffer BQ2 y centrifugar a 4500 x g por 10 minutos. Sacar la columna cuidadosamente para evitar que el fluido tome contacto con la salida de la columna. Para eluir el ADN, insertar la columna en un nuevo tubo colector de 15mL y añadir 200µL de buffer BE precalentado a 70°C directamente al centro de la membrana de silica, incubar a temperatura ambiente por 2 minutos y centrifugar a 4500 x g por 2 minutos.

Cuantificación del ADN

Para cuantificar el ADN se utilizó un equipo espectrofotométrico para microplacas Epoch™ Biotek® Instruments, Inc. Además, con el mismo equipo se determinará la pureza del ADN por medio del índice 260/280.

Finalmente, se realiza una normalización de las muestras obtenidas a una concentración de 6ng/µL diluyéndolas con agua destilada de grado molecular, para ser analizadas en un termociclador.

PCR (discriminación alélica)

Para llevar a cabo la genotipificación se usaron sondas TaqMan® con las secuencias específicas del SNP. Se debe tener precaución con la luz ya que es fotolábil, por lo que se cubre con papel aluminio. Se requiere de un MasterMix, el cual contiene la polimerasa, los nucleótidos y los cofactores; y agua destilada grado molecular. Las cantidades en las que se mezclan los reactivos están indicadas en la Tabla 2. El análisis de los genotipos se realiza en un termociclador Agilent Technologies, AriaMx Real-Time PCR System®, cuyo programa de temperatura se encuentra en la Tabla 3. Se deben seleccionar los fluoróforos FAM y VIC.

Tabla 2. Volúmenes de reactivos para solución de PCR

Reactivos	μL (x1 reacción)
MasterMix	5
Sonda TaqMan	0,175
H ₂ O	2,825
ADN (6ng/ μL)	2
Volumen final	10 μL

Tabla 3. Programa de temperatura para termociclador

Duración del ciclo	Temperatura (°C)	N° de ciclos
10 minutos	95	1
15 segundos	95	50
1 minuto	60	

El análisis de los resultados para la genotipificación se realizará con el software del termociclador, Agilent AriaMx 1.0®.

Análisis estadístico

Una vez obtenidos los genotipos de todos los pacientes, se procedió a determinar las frecuencias del alelo más común (A1) y del alelo menos común (A2 o MAF, *Minor Allele Frequency*) de cada grupo de pacientes (remisión y resistencia) para cada uno de los SNP. Luego de esto, se realizó la prueba de χ^2 para determinar si existían diferencias significativas entre ambos grupos. Se sigue el mismo procedimiento para las frecuencias genotípicas con la diferencia de que se determina el Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) en cada grupo de pacientes antes de hacer la prueba de χ^2 .

Los cálculos de HWE se realizaron con el calculador online “Court Lab – HW calculator (Michael H. Court 2005-2008)”. Las pruebas de χ^2 se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism® 7.0.

Resultados

Caracterización de pacientes

Se analizaron las fichas clínicas de 149 pacientes del Hospital Psiquiátrico El Salvador, Playa ancha, Valparaíso, que asistían regularmente a hacerse sus exámenes y controles médicos habituales. 30 de ellos fueron descartados ya que presentaban otro diagnóstico o más diagnósticos, y 8 porque no cumplían criterios de dosis y/o tiempo de tratamiento con clozapina. 15 rechazaron participar en el estudio y uno fue descartado debido a que, por la severidad de su condición, no estaba apto para consentir.

Finalmente, 95 pacientes cumplieron con los criterios de inclusión, aceptaron participar del estudio y firmaron el consentimiento informado. La edad de los pacientes iba desde los 15 a los 55 años.

Luego de realizada la extracción de sangre, se procedió a evaluar a los pacientes con la escala BPRS para clasificarlos en dos grupos, resultando 42 de ellos en remisión y 26 con resistencia al tratamiento.

Luego de realizada la extracción de sangre, se procedió a evaluar a los pacientes con la escala BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale) para clasificarlos en dos grupos, resultando 42 de ellos en remisión y 26 con resistencia al tratamiento. De cuatro de ellos no se obtuvo el ADN suficiente para hacer la genotipificación, quedando 40 y 24 respectivamente.

Gráficos de PCR

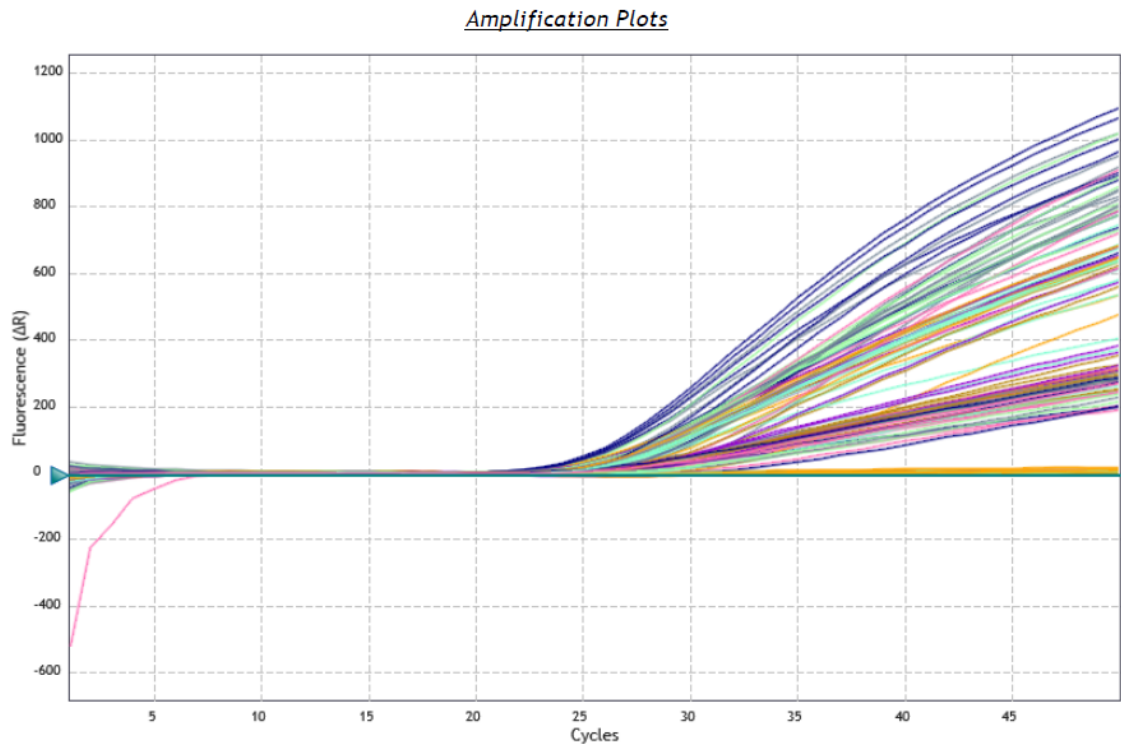


Figura 1. Gráfico de amplificación (fluorescencia versus ciclos) para el SNP rs2740210.

En este gráfico se observa la amplificación de ADN de las muestras versus la cantidad de ciclos de PCR. Para cada una de las muestras hay dos sondas que indican la cantidad de ADN de manera proporcional a su fluorescencia (VIC y FAM). Estas sondas son específicas para cada uno de los dos posibles alelos; por lo tanto, si una muestra es homocigota, se verá un incremento de la fluorescencia en solo una de las sondas; en cambio, si es heterocigota, el incremento se verá en ambas sondas.

Graphical Displays

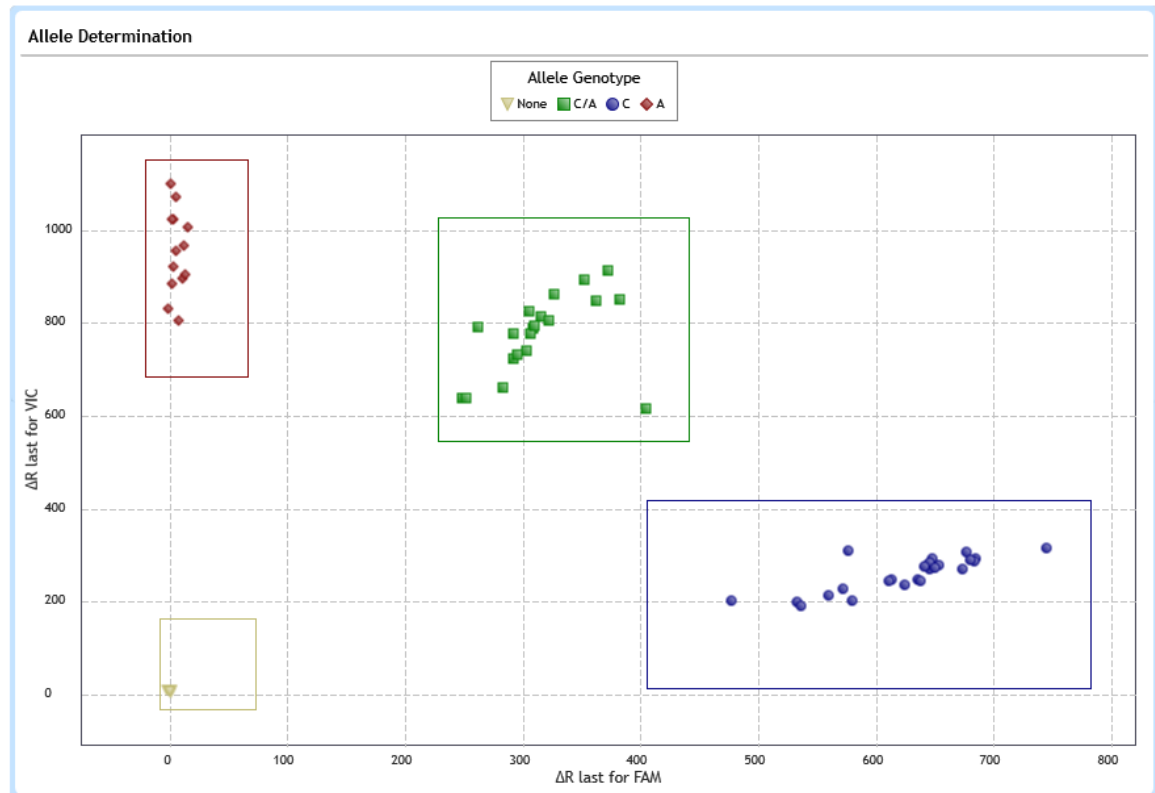


Figura 2. Gráfico de determinación genotípica (fluorescencia VIC versus fluorescencia FAM) para el SNP rs2740210.

Puede apreciarse el agrupamiento de los distintos grupos de acuerdo con su genotipo. De este modo, los individuos con el genotipo AA se agruparán hacia el área superior izquierda (rojo), dado que se obtiene fluorescencia únicamente por la sonda VIC que es específica para el alelo A. En el centro (verde) se ubican los individuos con el genotipo CA, ya que obtienen fluorescencia por ambas sondas, VIC y FAM. En la zona inferior derecha (azul), se encuentran los individuos con el genotipo CC que obtienen fluorescencia por la sonda FAM, específica para el alelo C.

Distribución de frecuencias alélicas

Tabla 4. Frecuencias alélicas en gen OXT (n=64)

SNP	Alelos		Estadística	
rs877172	A1: T	A2 (MAF): G	χ^2	<i>P</i>
Remisión, n (%)	46 (57,50)	34 (42,50)	3,07	0,08
Resistencia, n (%)	35 (72,92)	13 (27,08)		
SNP	Alelos		Estadística	
rs2740210	A1: C	A2 (MAF): A	χ^2	<i>P</i>
Remisión, n (%)	44 (55,00)	36 (45,00)	0,69	0,40
Resistencia, n (%)	30 (62,50)	18 (37,50)		
SNP	Alelos		Estadística	
rs2740204	A1: G	A2 (MAF): T	χ^2	<i>P</i>
Remisión, n (%)	45 (56,25)	35 (43,75)	0,47	0,49
Resistencia, n (%)	24 (50,00)	24 (50,00)		

Una vez realizada la genotipificación de los pacientes para cada uno de los polimorfismos involucrados, se procedió a determinar las frecuencias alélicas según la respuesta de éstos al tratamiento, con el fin de determinar si hay diferencias significativas entre pacientes en remisión y resistentes al tratamiento mediante la prueba de χ^2 .

En el gen OXT no se observan diferencias estadísticamente significativas entre pacientes en remisión y resistentes. (A1: alelo de mayor frecuencia; A2 o MAF: alelo de menor frecuencia).

Tabla 5. Frecuencias alélicas en gen OXTR (n=64)

SNP	Alelos		Estadística	
rs2254298	A1: G	A2 (MAF): A	χ^2	<i>P</i>
Remisión, n (%)	67 (83,75)	13 (16,25)	0,43	0,51
Resistencia, n (%)	38 (79,17)	10 (20,83)		
SNP	Alelos		Estadística	
rs53576	A1: G	A2 (MAF): A	χ^2	<i>P</i>
Remisión, n (%)	43 (53,75)	37 (46,25)	4,63	0,03
Resistencia, n (%)	35 (72,92)	13 (27,08)		
SNP	Alelos		Estadística	
rs2228485	A1: A	A2 (MAF): G	χ^2	<i>P</i>
Remisión, n (%)	57 (71,25)	23 (28,75)	0,98	0,32
Resistencia, n (%)	38 (79,17)	10 (20,83)		

En el SNP rs53576 del gen OXTR se observa un $P = 0,03$ (destacado en negrita), lo cual indica una diferencia significativa en la distribución de las frecuencias alélicas entre pacientes en remisión y resistentes.

Distribución de frecuencias genotípicas

Tabla 6. Frecuencias genotípicas en gen OXT (n=64)

SNP	Genotipos			Estadística		
rs877172	T T	T G	G G	HWE	χ^2	P
Remisión, n (%)	11 (27,50)	24 (60,00)	5 (12,50)	0,15	6,60	0,03
Resistencia, n (%)	14 (58,33)	7 (29,17)	3 (12,50)	0,20		
SNP	Genotipos			Estadística		
rs27401210	C C	C A	A A	HWE	χ^2	P
Remisión, n (%)	12 (30,00)	20 (50,00)	8 (20,00)	0,95	0,90	0,64
Resistencia, n (%)	10 (41,67)	10 (41,67)	4 (16,66)	0,59		
SNP	Genotipos			Estadística		
rs2740204	G G	G T	T T	HWE	χ^2	P
Remisión, n (%)	12 (30,00)	21 (52,50)	7 (17,50)	0,67	0,57	0,75
Resistencia, n (%)	6 (25,00)	12 (50,00)	6 (25,00)	1,00		

Una vez obtenidas las frecuencias alélicas, se procedió a ordenar las frecuencias genotípicas según la respuesta de los pacientes al tratamiento, con el fin de determinar si hay diferencias significativas entre los grupos de remisión y resistentes al tratamiento. Primero, se calculó si cada grupo de pacientes estaba dentro del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) mediante el calculador online “Court Lab – HW Calculator (Michael H. Court 2005-2008)”. Luego, se realizó la prueba χ^2 para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En el gen OXT, todos los grupos de pacientes en todos los polimorfismos están dentro del HWE, lo que indica que los alelos mantuvieron su frecuencia en la población a través de las generaciones. En el SNP rs877172 del gen OXT se

Tabla 7. Frecuencias genotípicas en gen OXTR (n=64)

SNP	Genotipos			Estadística		
rs2254298	G G	G A	A A	HWE	χ^2	<i>P</i>
Remisión, n (%)	29 (72,50)	9 (22,50)	2 (5,00)	0,27	3,50	0,17
Resistencia, n (%)	14 (58,33)	10 (41,67)	0 (0,00)	0,20		
SNP	Genotipos			Estadística		
rs53576	G G	G A	A A	HWE	χ^2	<i>P</i>
Remisión, n (%)	13 (32,50)	17 (42,50)	10 (25,00)	0,36	7,15	0,028
Resistencia, n (%)	11 (45,83)	13 (54,17)	0 (0,00)	0,07		
SNP	Genotipos			Estadística		
rs2228485	A A	A G	G G	HWE	χ^2	<i>P</i>
Remisión, n (%)	20 (50,00)	17 (42,50)	3 (7,50)	0,81	2,03	0,36
Resistencia, n (%)	16 (66,67)	6 (25,00)	2 (8,33)	0,24		

observa un $P = 0,03$ (destacado en negrita), lo cual indica una diferencia significativa en la distribución de las frecuencias genotípicas entre pacientes en remisión y resistentes (Tabla 6).

En el gen OXTR, todos los grupos de pacientes en todos los polimorfismos están dentro del HWE, lo que indica que los alelos mantuvieron su frecuencia en la población a través de las generaciones. En el SNP rs53576 del gen OXTR se observa un $P = 0,028$ (destacado en negrita), lo cual indica una diferencia significativa en la distribución de las frecuencias genotípicas entre pacientes en remisión y resistentes (Tabla 7).

Discusión

En la presente tesis se determinaron cambios en las frecuencias de polimorfismos de los genes de OXT y OXTR entre pacientes con diagnóstico de esquizofrenia refractaria respondedores y resistentes a tratamiento con clozapina. Al respecto, en el polimorfismo rs877172 del gen de OXT (Tabla 6) se detectó una diferencia estadísticamente significativa en la distribución de los genotipos. Souza y cols. en 2010 (38), en un estudio caso-control, trataron de establecer una relación entre la presencia de determinados polimorfismos y el riesgo de esquizofrenia, entre los que estaba rs877172, no mostrando relación significativa. Esta diferencia puede deberse a un aspecto metodológico, ya que en la presente tesis no existe un grupo control. Por otra parte, al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de este polimorfismo con diferentes poblaciones, se puede notar que el grupo de pacientes resistentes al tratamiento con clozapina es el que menos se asemeja a los demás (Alelo T, genotipos TT y TG, Tabla 8). También, en los pacientes con remisión al tratamiento con clozapina se puede apreciar diferencias en los genotipos respecto a las demás poblaciones.

Tabla 8. Distribución alélica y genotípica del polimorfismo rs877172 en distintas poblaciones.

Población	n	Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas			Referencias
		T	G	TT	TG	GG	
Remisión	40	0,58	0,42	0,28	0,60	0,12	Este estudio
Resistencia	24	0,73	0,27	0,58	0,29	0,13	Este estudio
Ambos	64	0,63	0,37	0,39	0,48	0,13	Este estudio
Americanos	-	-	-	-	-	-	-
Europeos	224	0,66	0,34	0,43	0,45	0,12	dbSNP (39)
Afroamericanos	46	0,54	0,46	0,26	0,57	0,17	dbSNP (39)
Total recopilación de base de datos	5008	0,57	0,43	-	0,490*	-	UCSC (40)

(*): estimación aritmética

Las distribuciones alélicas y genotípicas del polimorfismo rs53576 del gen de OXTR mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de remisión y resistencia al tratamiento (Tabla 5 y tabla 7), lo cual indicaría una posible relación entre la presencia del polimorfismo con la respuesta a clozapina. Sin embargo, esto no se condice con los estudios de Montag (41), en los que hay una mayor frecuencia del alelo A en los pacientes analizados respecto a los controles sanos. Además, se puede apreciar una similitud en los valores de las frecuencias alélicas de los pacientes resistentes a clozapina y los controles sanos del estudio de Montag y cols. ya mencionado. Al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas con otras poblaciones, se puede apreciar que los pacientes resistentes difieren de las demás, viéndose una mayor frecuencia del alelo G.

Tabla 9. Distribución alélica y genotípica del polimorfismo rs53576 en distintas poblaciones.

Población	n	Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas			Referencias
		G	A	GG	GA	AA	
Remisión	40	0,54	0,46	0,32	0,43	0,25	Este estudio
Resistencia	24	0,73	0,27	0,46	0,54	0,00	Este estudio
Ambos	64	0,61	0,39	0,38	0,47	0,16	Este estudio
Americanos	694	0,64	0,36	-	-	-	dbSNP (42)
Europeos	1006	0,65	0,35	-	-	-	dbSNP (42)
Afroamericanos	-	-	-	-	-	-	-
Total recopilación de base de datos	5008	0,61	0,39	-	0,476*	-	UCSC (43)

(*): estimación aritmética

Ambos polimorfismos, rs53576 y rs877172, están ubicados en secuencias intrónicas de sus respectivos genes (40, 43), por lo que su alteración podría afectar la estructura y estabilidad de los ARNm, y la generación de nuevos sitios de splicing o splicing alternativos (44), y, por consiguiente, alterar la estructura y/o función del péptido (OXT) o proteína (OXTR).

En los demás SNPs analizados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, posiblemente a que los polimorfismos no están relacionados con la respuesta a clozapina en esta población.

Sin embargo, en todos estos casos, se debe tener en cuenta la posibilidad de que la falta de respuesta al tratamiento con clozapina se deba a la presencia de otros polimorfismos involucrados con la farmacocinética de la clozapina o con su mecanismo de acción. Una de las proteínas involucradas en el metabolismo de la clozapina es la glicoproteína-P (P-gp) o MDR1 (*multidrug resistance protein 1*). Es una bomba de eflujo transmembrana que expulsa sustancias desde el interior de la célula hacia el exterior (45). En un estudio del 2009 (46) con pacientes tratados con clozapina, se encontró que quienes tenían el polimorfismo 3435CC necesitaban dosis más altas para alcanzar las mismas concentraciones plasmáticas respecto de quienes tenían genotipo CT o TT. Similares resultados obtuvieron Jaquenoud y cols. (47) en pacientes con el genotipo 3435TT, que tenían concentraciones plasmáticas de clozapina 1,6 veces más altas que los de otro genotipo.

Por otra parte, el citocromo 1A2 (CYP1A2) es una de las principales enzimas metabolizadoras de clozapina. Los pacientes con los SNP rs2069521A o rs2069522C tendían a tener mayores concentraciones plasmáticas de clozapina, sin embargo, la significancia estadística se perdía luego de la corrección por múltiples comparaciones (48). Además, el polimorfismo CYP1A2*1F fue asociado a la respuesta de clozapina en un grupo de pacientes con esquizofrenia “súper-refractaria” (49). Sin embargo, hay estudios en los que no se ha hallado una relación significativa entre la presencia del polimorfismo y los niveles plasmáticos de clozapina (50, 51).

Respecto al mecanismo de acción, la clozapina actúa sobre una gran variedad de receptores de neurotransmisores (dopaminérgicos, serotoninérgicos, adrenérgicos) (10), en los que también existen polimorfismos. Hay reportes de que el polimorfismo Ser9Gly del receptor D3 de dopamina estaría relacionado a una

menor respuesta a la clozapina (52, 53). Mientras tanto, se han publicado variados estudios sobre los genes de receptores de serotonina, en los que se le asocia la presencia de polimorfismos y la respuesta a la clozapina (54-57).

No es posible predecir la respuesta a la clozapina con la determinación de polimorfismos individualmente, por lo tanto, es necesario realizar un análisis de haplotipos con el fin de dilucidar si, bajo dicha aproximación, pueden revelarse combinaciones de polimorfismos en los genes aquí estudiados que estén asociados a la respuesta al tratamiento. Del mismo modo, se hace necesario incorporar el análisis de variantes genéticas en otros de los genes aquí descritos, tales como bombas de eflujo o dianas farmacológicas de clozapina. De esta forma, podrá avanzarse en el establecimiento de un panel de análisis de varios polimorfismos relevantes para la población chilena, que oriente al profesional clínico a la hora de seleccionar de mejor forma el tratamiento farmacológico o plantear desde el inicio del tratamiento la intervención a realizar a futuro, con un seguimiento más estricto en los pacientes con elementos de riesgo.

Conclusiones

Se genotipificaron y se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de todos los pacientes, estando todas las subpoblaciones dentro del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en dos de los seis polimorfismos estudiados (rs877172 en gen de OXT y rs53576 en gen de OXTR), que los pondrían como posibles candidatos en la variabilidad de respuesta al tratamiento con clozapina.

Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios, y con un tamaño muestral mayor, para obtener conclusiones más significativas.

Bibliografía

- (1) American Pshychiatric Association. 2010. Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia. Am J psychiatry. 61, 65, 67 pp.
- (2) Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. 2005. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. PLoS Medicine. 2:0413–0433.
- (3) McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C, Chant D. 2004. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. BMC Medicine. 2:13
- (4) Ministerio de Salud. 2009. Guía clínica para el tratamiento de personas desde el primer episodio de esquizofrenia. MINSAL, Santiago. 9 pp.
- (5) Vicente B, Rioseco P, Saldivia S, Kohn R, Torres S. 2002. Estudio chileno de prevalencia de patología psiquiátrica (DSM-III-R/CIDI) (ECCP). Rev Méd Chile 130:527-536.
- (6) Ministerio de Salud. 2017. Guía Clínica AUGÉ: Para el tratamiento de personas desde el primer episodio de Esquizofrenia. 3ra edición, Santiago. 34, 35, 59 pp.
- (7) Thibaut F. 2014. Acute treatment of schizophrenia: introduction to the Word Federation of Societies of Biological Psychiatry guidelines. Psychiatr Danub. 26:2-11
- (8) Kuipers E, Yesufu-Udechuku A, Taylor C, Kendall T. 2014. Management of psychosis and schizophrenia in adults: summary of updated NICE guidance. BMJ. 348:g1173.
- (9) Warnez S, Alessi-Severini S. 2014. Clozapine: a review of clinical practice guidelines and prescribing trends. BMC Psychiatry.14:102.
- (10) Iqbal MM, Rahman A, Husain Z, Mahmud SZ, Ryan WG, Feldman JM. 2003. Clozapine: a clinical review of adverse effects and management. Ann Clin Psychiatry.15:33-48.
- (11) Flórez J, Armijo J, Mediavilla A. 2014. Farmacología Humana. 6ta edición. Elsevier Masson. Barcelona, España. 528 pp.
- (12) Gimpl G, Fahrenholz F. 2001. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. Physiol Rev. 81:629–683.

- (13) National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2017. OXT oxytocin/neurophysin I prepropeptide [*Homo sapiens* (human)] <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>> (Página visitada el 5 de julio del 2017)
- (14) neXtProt. 2017. OXT – Oxytocin-Neurophysin 1 – Exons. <<https://www.nextprot.org>> (Página visitada el 5 de julio del 2017)
- (15) Feldman R, Monakhov M, Pratt M, Ebstein RP. 2016. Oxytocin Pathway Genes: Evolutionary Ancient System Impacting on Human Affiliation, Sociality, and Psychopathology. *Bio Psychiatry*. 79:174–184.
- (16) Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH, Scott Young W. 2009. Oxytocin: The great facilitator of life. *Prog Neurobiol*. 88:127–151.
- (17) van Os J, Kapur S. 2009. Schizophrenia. *Lancet*. 374:635–645.
- (18) Caldwell HK. 2012. Neurobiology of sociability. *Adv Exp Med Biol*. 739:187-205.
- (19) Bartholomeusz CF, Ganella EP, Labuschagne I, Bousman C, Pantelis C. 2015. Effects of oxytocin and genetic variants on brain and behaviour: Implications for treatment in schizophrenia. *Schizophr Res*. 168:614–627.
- (20) Lavoie MA, Plana I, Lacroix JB, Godmaire-Duhaime F, Jackson PL, Achim AM. 2013. Social cognition in first-degree relatives of people with schizophrenia: A meta-analysis. *Psychiatry Res*. 209:129–135.
- (21) Domes G, Heinrichs M, Miguel A, Berger C, Herpertz SC. 2007. Oxytocin improves “mind-reading” in humans. *Biol Psychiatry*. 61:731-733.
- (22) Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ, Fischbacher U, Fehr E. 2005. Oxytocin increases trust in humans. *Nature*. 435: 673-6.
- (23) Rubin LH, Carter CS, Drogos L, Pournajafi-Nazarloo H, Sweeney JA, Maki PM. 2010. Peripheral oxytocin is associated with reduced symptom severity in schizophrenia. *Schizophr Res*. 124:13–21.
- (24) Souza RP, de Luca V, Meltzer HY, Lieberman JA, Kennedy JL. 2010. Schizophrenia severity and clozapine treatment outcome association with oxytocinergic genes. *Int J Neuropsychopharmacol*. 13:793–798.
- (25) Uhrig S, Hirth N, Broccoli L, von Wilmsdorff M, Bauer M, Sommer C, Zink M, Steiner J, Frodi T, Malchow B, Falkai P, Spanagel R, Hansson AC, Schmitt A. 2016. Reduced oxytocin receptor gene expression and binding sites in different brain regions in schizophrenia: A post-mortem study. *Schizophr Res*. 177:59–66.

- (26) Goldman M, Marlow-O'Connor M, Torres I, Carter CS. 2008. Diminished plasma oxytocin in schizophrenic patients with neuroendocrine dysfunction and emotional deficits. *Schizophr Res.* 98:247–255.
- (27) Caldwell HK, Stephens SL, Young WS. 2009. Oxytocin as a natural antipsychotic: a study using oxytocin knockout mice. *Mol Psychiatry.* 14:190–196.
- (28) Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR, Winslow JT. 2000. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Gene.* 25:284–288.
- (29) Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. 2001. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci.* 21:8278–8285.
- (30) Engelmann M, Ebner K, Wotjak CT, Landgraf R. 1998. Endogenous oxytocin is involved in short-term olfactory memory in female rats. *Behav Brain Res.* 90:89–94.
- (31) Teltsh O, Kanyas-Sarner K, Rigbi A, Greenbaum L, Lerer B, Kohn Y. 2011. Oxytocin and vasopressin genes are significantly associated with schizophrenia in a large Arab-Israeli pedigree. *Int J Neuropsychopharmacol.* 15:309-319.
- (32) Rodrigues SM, Saslow LR, García N, John OP, Keltner D. 2009. Oxytocin receptor genetic variation relates to empathy and stress reactivity in human. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:21437-21444.
- (33) Montag C, Brockmann EM, Lehmann A, Müller DJ, Rujescu D, Gallinat J. 2012. Association between oxytocin receptor gene polymorphisms and self-rated “empathic concern” in schizophrenia. *PLoS ONE.* 7:e51882.
- (34) Tost H, Kolachana B, Verchinski BA, Bilek E, Goldman AL, Mattay VS, Weinberger DR, Meyer-Lindenberg A. 2011. Neurogenetic effects of OXTR rs2254298 in the extended limbic system of healthy caucasian adults. *Biol Psychiatry* 70:e37-e39.
- (35) Uvnäs-Moberg K, Alster P, Svensson TH. 1992. Amperozide and clozapine but not haloperidol or raclopride increase the secretion of oxytocin in rats. *Psychopharmacology.* 109:473–476.
- (36) Feifel D, MacDonald K, Nguyen A, Cobb P, Warlan H, Galangue B, Minassian A, Becker O, Cooper J, Perry W, Lefebvre M, Gonzales J, Hadley, A. 2010. Adjunctive intranasal oxytocin reduces symptoms in schizophrenia patients. *Biol Psychiatry.* 68:678–680.

- (37) Shilling PD, Feifel D. 2016. Potential of Oxytocin in the Treatment of Schizophrenia. *CNS Drugs*. 30:193–208.
- (38) Souza RP, Ismail P, Meltzer HY, Kennedy JL. 2010. Variants in the oxytocin gene and risk for schizophrenia. *Schizophr Res*. 121:279–280.
- (39) dbSNP, Short Genetic Variations. 2017. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs877172. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>> (Página visitada el 7 de noviembre de 2017).
- (40) University of Santa Cruz California (UCSC) Genome Browser, Simple Nucleotide Polymorphisms (dbSNP 147). 2015. dbSNP build 147 rs877172. <<https://genome.ucsc.edu>> (Página visitada el 7 de noviembre de 2017).
- (41) Montag C, Brockmann EM, Bayerl M, Rujescu D, Müller DJ, Gallinat J. 2012. Oxytocin and oxytocin receptor gene polymorphisms and risk for schizophrenia: A case-control study. *World J Biol Psychiatry*. 14:500-508.
- (42) dbSNP, Short Genetic Variations. 2017. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs53576. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>> (Página visitada el 7 de noviembre de 2017).
- (43) University of Santa Cruz California (UCSC) Genome Browser, Simple Nucleotide Polymorphisms (dbSNP 147). 2015. dbSNP build 147 rs53576. <<https://genome.ucsc.edu>> (Página visitada el 7 de noviembre de 2017).
- (44) Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. 2013. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): Implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac Med Mex*. 149:220–228.
- (45) Fromm MF. 2003. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur J Clin Invest*. 33 Suppl 2:6–9.
- (46) Consoli G, Lastella M, Ciapparelli A, Catena Dell’Osso M, Ciofi L, Guidotti E, Danesi R, Dell’Osso L, Del Tacca M, Di Paolo, A. 2009. ABCB1 polymorphisms are associated with clozapine plasma levels in psychotic patients. *Pharmacogenomics*. 10:1267–1276.
- (47) Jaquenoud Sirot, E, Knezevic B, Morena GP, Harenberg S, Oneda B, Crettol S, Ansermot N, Baumann P, Eap CB. 2009. ABCB1 and Cytochrome P450 Polymorphisms: clinical pharmacogenetics of clozapine. *J Clin Psychopharmacol*. 29:319–326.

- (48) Lee ST, Ryu S, Kim SR, Kim MJ, Kim S, Kim JW, Lee SY, Hong KS. 2012. Association Study of 27 Annotated Genes for Clozapine Pharmacogenetics. *J Clin Psychopharmacol.* 32:441–448.
- (49) de Brito RB, de Carvalho Araújo L, Diniz MJA, de Castro Georg R, Nabout JC, Vianelo RP, da Silva Santos R, da Silva Cruz AH, Ghedini PC. 2015. The CYP1A2-163C>A polymorphism is associated with super-refractory schizophrenia. *Schizophr Res.* 169:502-503.
- (50) van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ. 2003. The effect of smoking and cytochrome P450 CYP1A2 genetic polymorphism on clozapine clearance and dose requirement. *Pharmacogenetics.* 13:169–172.
- (51) Kootstra-Ros JE, Smallegoor W, van der Weide J. 2005. The cytochrome P450 CYP1A2 genetic polymorphisms *1F and *1D do not affect clozapine clearance in a group of schizophrenic patients. *Ann Clin Biochem.* 42: 216–219.
- (52) Scharfetter J, Chaudhry HR, Hornik K, Fuchs K, Sieghart W, Kasper S, Aschauer, H. N. 1999. Dopamine D3 receptor gene polymorphism and response to Clozapine in schizophrenic Pakistani patients. *Eur Neuropsychopharmacol.* 10:17–20.
- (53) Shaikh S, Collier DA, Sham PC, Ball D, Aitchison K, Vallada H, Smith I, Gill M, Kerwin RW. 1996. Allelic association between a Ser-9-Gly polymorphism in the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Hum Genet.* 97:714–719.
- (54) Arranz MJ, Munro J, Owen MJ, Spurlock G, Sham PC, Zhao J, Kirov G, Collier DA, Kerwin RW. 1998. Evidence for association between polymorphisms in the promoter and coding regions of the 5-HT2A receptor gene and response to clozapine. *Mol Psychiatry.* 3:61–66.
- (55) Sodhi MS, Arranz MJ, Curtis D, Ball DM, Sham P, Roberts GW, Price J, Collier DA, Kerwin RW. 1995. Association between clozapine response and allelic variation in the 5-HT2C receptor gene. *Neuroreport.* 7:169-172.
- (56) Arranz M, Collier D, Sodhi M, Ball D, Roberts G, Price J, Sham P, Kerwin R. 1995. Association between clozapine response and allelic variation in the 5-HT2A receptor gene. *Lancet.* 346:281-282
- (57) Yu YW, Tsai SJ, Lin CH, Hsu CP, Yang KH, Hong CJ. 1999. Serotonin-6 receptor variant (C267T) and clinical response to clozapine. *Neuroreport.* 10:1231–1233.

Anexos

Anexo 1: Genotipos de pacientes

Tabla 1. Genotipos de pacientes en remisión a tratamiento con clozapina (A1; alelo de mayor frecuencia; A2 (MAF): alelo de menor frecuencia, *minor allele frequency*; 11: homocigoto para el alelo de mayor frecuencia; 12: heterocigoto; 22: homocigoto para el alelo de menor frecuencia).

Gen	OXT			OXTR		
	rs877172	rs2740210	rs2740204	rs2254298	rs53576	rs2228485
Posición	3069244	3072609	3081821	8760542	8762685	8768017
A1	T	C	G	G	G	A
A2 (MAF)	G	A	T	A	A	G
11	TT	CC	GG	GG	GG	AA
12	TG	CA	GT	GA	GA	AG
22	GG	AA	TT	AA	AA	GG
BM118411	12	12	12	11	12	11
BM72360	12	12	12	12	22	11
BM64661	12	12	12	11	22	11
BM100632	12	12	12	11	22	11
BM95220	12	12	12	11	11	12
BM118526	11	22	22	11	22	11
BM85134	12	12	22	11	12	12
BM94649	11	11	11	12	12	12
BM137151	11	12	12	11	11	12
BM124990	22	11	11	11	22	11
BM115955	22	11	11	11	22	11
BM107125	12	22	12	11	22	11
BM71397	12	22	22	12	12	12
BM106722	12	11	11	11	12	12
BM102766	12	11	12	11	11	11
BM107859	12	12	12	12	11	11
BM102961	12	12	12	11	22	11
BM108966	12	11	12	22	12	12
BM75927	22	11	11	11	11	12
BM97655	11	12	12	12	11	12
BM131103	12	12	11	11	11	22
BM64069	12	22	11	12	12	12
BM107125	12	12	12	11	22	11
BM90328	12	12	12	11	11	12
BM124902	22	11	11	11	12	11
BM105360	12	12	22	12	11	11
BM100471	12	12	12	12	12	12
BM91192	12	12	12	11	12	12
BM100632	12	12	12	11	22	11
BM117679	11	22	22	11	12	12

BM123178	11	11	11	11	11	22
BM94868	11	22	12	11	12	11
BM118236	11	22	22	12	11	11
BM91623	12	11	11	11	12	12
BM77922	11	11	11	11	12	11
BM121268	11	22	22	11	11	22
BM64661	12	12	12	11	12	11
BM74849	22	11	11	11	11	12
BM104172	11	12	12	11	12	11
BM108235	12	12	12	22	12	12

Tabla 2. Genotipos de pacientes con resistencia a tratamiento con clozapina (A1: alelo de mayor frecuencia; A2 (MAF): alelo de menor frecuencia, *minor allele frequency*; 11: homocigoto para el alelo de mayor frecuencia; 12: heterocigoto; 22: homocigoto para el alelo de menor frecuencia).

Gen	OXT			OXTR		
	rs877172	rs2740210	rs2740204	rs2254298	rs53576	rs2228485
Posición	3069244	3072609	3081821	8760542	8762685	8768017
A1	T	C	G	G	G	A
A2 (MAF)	G	A	T	A	A	G
11	TT	CC	GG	GG	GG	AA
12	TG	CA	GT	GA	GA	AG
22	GG	AA	TT	AA	AA	GG
BM105448	11	12	12	11	12	12
BM104198	11	11	22	12	12	11
BM58251	11	11	12	11	12	11
BM73435	12	11	12	12	12	11
BM92600	22	12	11	11	12	12
BM103941	11	12	12	11	11	11
BM67757	11	22	22	11	11	12
BM96992	12	11	11	11	12	11
BM62803	22	11	11	12	11	12
BM53585	11	11	11	12	12	11
BM75561	11	12	12	11	11	11
BM106515	11	11	22	11	11	22
BM71673	12	12	12	12	12	11
BM123968	12	12	12	11	11	11
BM83119	12	12	12	11	11	11
BM78020	11	22	22	12	12	22
BM53585	11	11	11	12	12	11
BM83812	11	22	12	12	11	12
BM65152	12	11	12	12	11	12
BM96426	12	12	12	11	12	11
BM72421	11	12	22	11	11	11
BM122405	22	11	11	12	12	11
BM75561	11	12	12	11	12	11
BM106951	11	22	22	11	11	11