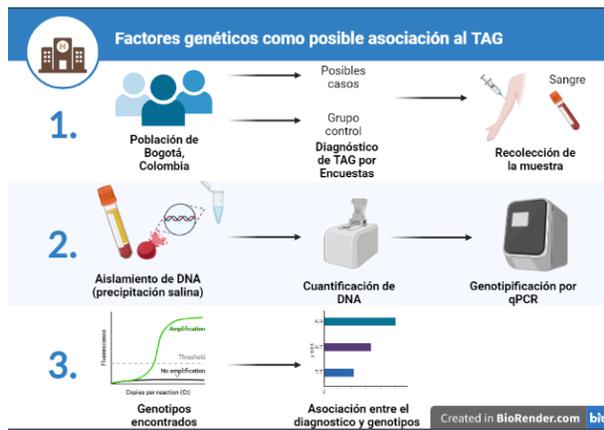


Determinación de polimorfismos en los genes de los miR-494, miR-155, miR-144 miR-17, miR-663, miR-4505 y su correlación con trastorno de ansiedad generalizada en una muestra de Bogotá, Colombia

Determination of polymorphisms in the miR-494, miR-155, miR-144 miR-17, miR-663, miR-4505 genes and their correlation with generalized anxiety disorder in a sample from Bogotá, Colombia



Selección de los grupos de interés que accedieron a realizar 2 test y a la extracción de sangre para analizar polimorfismos por PCR en tiempo real

Determinación de polimorfismos en los genes de los miR-494, miR-155, miR-144 miR-17, miR-663, miR-4505 y su correlación con trastorno de ansiedad generalizada en una muestra de Bogotá, Colombia

Determination of polymorphisms in the miR-494, miR-155, miR-144 miR-17, miR-663, miR-4505 genes and their correlation with generalized anxiety disorder in a sample from Bogotá, Colombia

Santiago Zamora Gómez

Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.

Dirigido por: La Dra. Martha Liliana Trujillo Güiza y la Dra Yeimy González Giraldo

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar si existe asociación entre los polimorfismos de un solo nucleótido de los genes de los microRNAs miR-494, miR-155, miR-144-3p y miR-17, miR-663 y miR-4505, con el diagnóstico de trastorno de ansiedad generalizada (TAG) en una muestra de personas de Bogotá, Colombia. Se originaron dos grupos de participantes, clasificándolos según los puntajes obtenidos de estas dos encuestas: la encuesta Hospitalaria de Ansiedad y Depresión (HADS), y la escala de autoevaluación para ansiedad de Zung; quienes sobrepasaron el punto de corte de las dos escalas se clasificaron como grupo TAG y aquellos que obtuvieron un puntaje por debajo al corte se clasificaron como control. Para la búsqueda de los SNPs presentes en genes de miRNA propuestos, se utilizaron bases de datos como miRNASNP-v3 y PubMed. Los reportes en la literatura proporcionaron información acerca de la frecuencia con la que estos se presentan en la población latinoamericana. Adicionalmente, con las herramientas ToppFun y TarBase v.8 se identificaron genes que son regulados por los miRNA y algunas de sus funciones. Se observó que la mayoría de los SNP presentan frecuencias menores a 0,1, imposibilitando la genotipificación de alguno por la bajas probabilidad de encontrarlo en la población estudiada. Como alternativa, se genotipificó el rs1452789 (A/T) del gen TCF4 y se encontró que este SNP no presenta una asociación significativa como un factor de riesgo para TAG

Palabras clave: SNP, microRNAs, trastorno de ansiedad, polimorfismos, genética

Abstract

The aim of this work was to determine if there is an association between a single nucleotide polymorphism of the genes of miR-494, miR-155, miR-144-3p and miR-17, miR-663 and miR-4505, with the diagnosis of generalized anxiety disorder (GAD) in a sample of participants from Bogotá, Colombia. Two groups of participants were classified according to the scores obtained from two scales: the Hospital Anxiety and Depression Survey (HADS), and the Zung Self-Assessment Scale for Anxiety; those who exceeded the cut-off point of the two scales were classified as GAD group and those who scored below the cutoff were classified as control. For the search of the SNPs in proposed miRNA genes, we used databases such as miRNASNP-v3 and PubMed. Reports in the literature provided information about the frequency with which these SNPs occur in the Latin American population. Additionally, we identified genes regulated by the miRNAs with ToppFun and TarBase v.8, and some of the functions. Most SNPs have frequencies less than 0.1, making it impossible to genotype some of them due to the low probability of finding them in the studied population. As an alternative, the rs1452789 (A/T) in the *TCF4* gene was genotyped and it was found that this SNP does not present a significant association as a risk factor for GAD.

Keywords: SNP, miRNA, anxiety disorder, polymorphism, genetics

Introducción

Los trastornos de ansiedad tienen alta prevalencia en Colombia, entre ellos el trastorno de ansiedad generalizada (TAG); factores como el uso de drogas y alcohol, traumas infantiles, desplazamientos forzados, económicos, malas experiencias, entre otros, han sido asociados como factores de riesgo para estos trastornos. “Un individuo con TAG se caracteriza por tener una preocupación y ansiedad excesivas (expectativa aprensiva o aprensión ansiosa), persistentes (más de la mitad de los días durante al menos 6 meses) y difíciles de controlar sobre un número de acontecimientos o actividades tales como el rendimiento laboral o escolar”, es preocupante porque esto conlleva a que una persona pueda padecer trastornos más graves o sea dependiente de sustancias psicoactivas y/o alcohol (López, 1998).

En el 2003 el Estudio Nacional de Salud Mental-Colombia, evaluó la prevalencia de los trastornos de ansiedad, entre ellos el TAG; el cual fue uno de los trastornos con menor prevalencia: 1,3% en la prevalencia de vida, 0,7 en la prevalencia de 12 meses y 0,3 en la prevalencia de 30 días (Posada-Villa et al., 2006). Los factores asociados más importantes fueron la edad, sexo, estado civil, sistema de seguridad social, entre otros. En 2015 se realizó la Encuesta Nacional de Salud Mental, que reportó que la prevalencia del trastorno de ansiedad generalizada era de un 0,4% en los últimos 12 meses evaluados para niños, 0,3% en toda la vida en adolescentes y 1,3% en toda la vida en adultos (*Salud Mental Encuesta Nacional de 2015*, n.d.). Otro hecho importante es el contexto histórico en el que se ha desarrollado Colombia durante los últimos 60 años (Martínez et al., 2016), ya que la violencia y el conflicto armado que se ha vivido, ha causado que en las poblaciones más afectadas (desplazados), generen una alta prevalencia de trastornos mentales, entre los que se destaca el TAG (Gómez-Restrepo et al., 2016).

La pandemia causada por el COVID-19 ha supuesto un reto para la salud mental, aunque debido a esta no pudo realizarse la Encuesta Nacional de Salud Mental, que se realiza cada cinco años, se observó un aumento notorio del número de personas atendidas y el número de atenciones registradas en el año 2019 en comparación a años anteriores, pero con una disminución en el 2020 (*Las Cifras de La Salud Mental En Pandemia*, n.d.). En 2021 el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) demostró los efectos negativos que ha tenido la pandemia en la salud mental de los colombianos, ya que las “medidas como el distanciamiento físico, las cuarentenas obligatorias, el cierre de instituciones educativas y con ellas los cambios en las tareas de los hogares, son factores que afectan la salud mental, llegando a provocar incrementos en el número de casos de estrés, ansiedad y depresión”. En las encuestas realizadas por el DANE, la respuesta más frecuente después de “ninguna de las anteriores” es la de “preocupación o nerviosismo”. En este trabajo se encontró alta prevalencia de trastornos mentales en población joven y en mujeres (Arango et al., n.d.)

Se sugiere que los miRNA podrían correlacionarse con ciertos trastornos mentales, ya que estos desempeñan funciones importantes en la regulación de genes codificantes de proteínas que se expresan en distintas zonas del cerebro; Los estudios de correlación de microRNAs afectados por polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), en distintos trastornos, incluido el TAG, han cobrado importancia para entender sus funciones (Murphy & Singewald, 2019). Los miRNA son moléculas de cadena corta de RNA de aproximadamente 22 nucleótidos que se transcriben del DNA y no son codificantes; entre los distintos mecanismos de regulación de la expresión génica, se han descrito a los miRNA como importantes reguladores epigenéticos que se unen al mRNA impidiendo su traducción al obstaculizar la unión del mRNA con la maquinaria de traducción o haciendo que directamente se degrade el mRNA (de Sousa et al., 2019). Su función regulatoria se puede

ver alterada por cambios importantes como los SNPs, y dependiendo de la posición en la que se encuentre el polimorfismo, puede afectar su expresión y/o la cantidad de genes que regula ocasionando un desequilibrio en mecanismos bioquímicos (Liu et al., 2021; Ramírez-Bello et al., 2013).

Los polimorfismos ocurren en el 0.1% de los genes, significativamente es lo que diferencia a los individuos entre una misma especie, dando a lugar a lo que se conoce como fenotipo (Ramírez-Bello et al., 2013). Entre los polimorfismos más comunes están los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), esto es el cambio de un solo nucleótido a nivel del DNA generando dos alelos en un gen. Si el cambio del nucleótido está presente en el 1% de la población o más, se consideran un SNP, pero no suelen ser causantes de una patología por sí solos. Los SNPs pueden localizarse en la región promotora del gen, intrones, sitios de splicing y regiones intragénicas (Caratachea, 2007; *Single Nucleotide Polymorphism / SNP / Learn Science at Scitable*, n.d.). La susceptibilidad a enfermedades y los efectos negativos en moléculas de miRNA como su biogénesis y las interacciones que tiene con sus dianas han sido factores asociados a los polimorfismos. Poder identificar estos cambios genéticos puede ser útil para comprender la patogenia de los trastornos mentales y así establecer bases que puedan facilitar el diagnóstico e intervenciones terapéuticas específicas, asequibles y viables en el país (Brzezinski et al., 2006; Forero et al., 2014; Ramírez-Bello et al., 2013).

El TAG y en general muchas enfermedades mentales se suelen diagnosticar mediante pruebas psicológicas; sin embargo, no se conocen pruebas que implementen marcadores biológicos para identificar el TAG. Existen técnicas que podrían apoyar en la detección temprana y al diagnóstico de enfermedades. Por lo tanto, con el objetivo de determinar una posible correlación entre algunos SNPs presentes en genes de miRNA y el TAG se planteó utilizar la PCR en tiempo real, técnica usada en diferentes áreas de la investigación, que amplifica y detecta genes de forma muy precisa (Aguilera et al., 2014).

1. Objetivos

1.1. General

Determinar si existe correlación entre polimorfismos de miR-494, miR-155, miR-144-3p y miR-17, miR-663, miR-4505 con el diagnóstico de TAG en una muestra de personas de Bogotá, Colombia.

1.2. Específicos

- Identificar polimorfismos en los genes de los miRNA propuestos mediante métodos *in silico* para los análisis moleculares
- Genotipificar los polimorfismos seleccionados en genes de miRNA en participantes que hayan sido diagnosticados con TAG y un grupo control mediante PCR tiempo real
- Analizar la relación entre el diagnóstico del TAG y los genotipos identificados en la muestra seleccionada.
- Determinar el grado de asociación del polimorfismo rs1452789 del gen *TCF4* con TAG.

2. Materiales y Métodos

Este proyecto está enmarcado dentro del proyecto titulado “Análisis de factores de riesgo moleculares y psicosociales para trastorno de ansiedad generalizada y endofenotipos relacionados con una muestra de Bogotá, Colombia”, por lo que las muestras, materiales y reactivos para el desarrollo de este trabajo de grado fueron aportadas por el proyecto de investigación, el cuál es financiado por el Ministerio de ciencia.

2.1 Selección de Participantes

Los participantes se clasificaron en dos grupos según el punto de corte para la encuesta Hospitalaria de Ansiedad y Depresión (HADS) y la escala de autoevaluación para ansiedad de Zung, aquellos participantes con puntajes mayores a 8 y 36 respectivamente en las dos escalas se incluyeron en el grupo de casos (con rasgos de TAG), los participantes con puntajes por debajo del punto de corte conformaron el grupo control.

2.2 Selección de Polimorfismos

El criterio principal que se tomó en cuenta para de la selección de los polimorfismos fue el valor de la frecuencia del alelo menor, del inglés *minor allele frequency (MAF)*, que indica la frecuencia con la que se presenta el segundo alelo más frecuente de distintas poblaciones y a nivel global; en las bases de datos que se describirán posteriormente, se presenta los valores *MAF* correspondientes a la población latinoamericana. Teniendo en cuenta el tamaño de la muestra se consideraron valores $MAF > 0.1$ para garantizar una mayor probabilidad de encontrar los alelos en la población de Bogotá, Colombia.

Se utilizó la base de datos miRNASNP-v3 que relaciona los SNPs y sus efectos sobre los miRNA (relación a enfermedades, cambios en la región semilla, ganancia o pérdida de dianas y aumento o descenso de la expresión de RNA (Liu et al., 2021). Además, para ampliar la lista de los polimorfismos, se realizó la búsqueda bibliográfica de SNPs que no identificaron en las bases de datos. De los SNPs obtenidos de las distintas fuentes se corroboraron las frecuencias y el gen al que pertenecían en la base dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

2.3 Enriquecimiento de genes

Se realizó la búsqueda de los genes diana de cada uno de los miRNA a partir de la base de datos TarBase V8 (Karagkouni et al., 2018); para esto se tuvo en cuenta el uso de la nomenclatura en la que “el sufijo -5p o -3p se agrega al nombre original cuando dos miRNAs maduros derivan de los brazos opuestos del precursor” (Ávila-Moreno et al., 2011); como ejemplo se encuentra el hsa-miR155-3p. Para la búsqueda se tomaron en cuenta los genes regulados por el brazo 5p y 3p. Los datos se filtraron por: Tipo de método: Alto rendimiento, Tipo de validación: Directo y Validado como: positivo positivo en la base de datos Tarbase (Karagkouni et al., 2018).

Para realizar un análisis de enriquecimiento funcional de los genes diana, se empleó la aplicación ToppFun de la herramienta ToppGene (*ToppFun - Functional Enrichment*, n.d.) utilizando el filtrado con las siguientes categorías: enfermedades, Gene Ontology (Go): componente celular, Go: proceso biológico, Go: función molecular, vías y fenotipo humano. A continuación, se seleccionaron los procesos presentes en las categorías con un valor de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (*FDR B&H*) menor a 0,05.

2.4 Extracción de DNA (precipitación salina)

La extracción de DNA se realizó a partir de la sangre periférica de los participantes del estudio por el método de precipitación salina, un proceso que se basa en lisar las células sanguíneas para separar el DNA de los demás componentes sanguíneos por centrifugación. Este proceso se evidencia en la figura 1 donde el producto final es el DNA suspendido en una solución buffer lista para realizar la qPCR (Payarés & Mancilla, 2012).

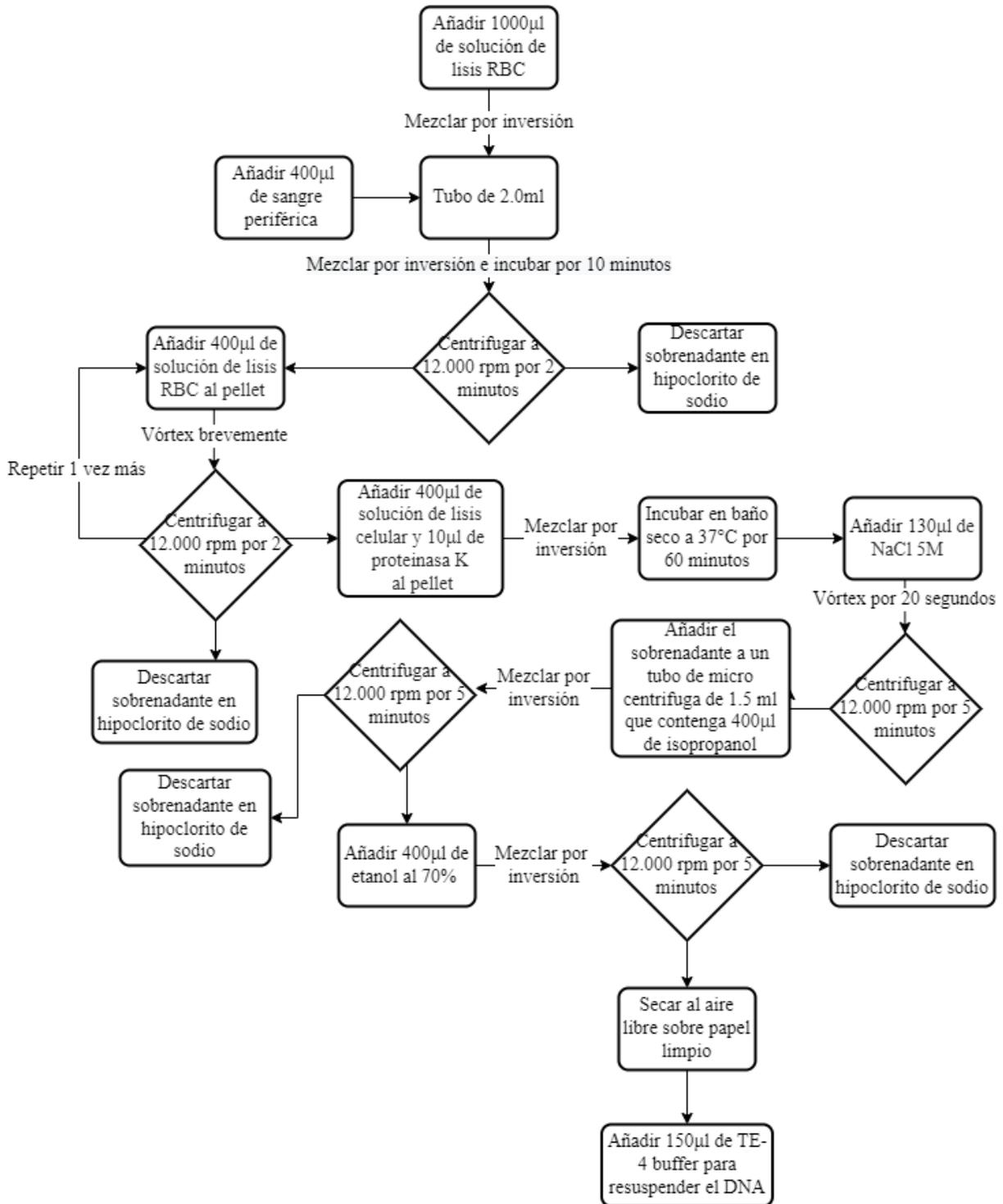


Figura 1. Flujograma para la extracción de DNA.
 RBC: Red Blood Cell

2.5 Genotipificación de los polimorfismos por qPCR

En la tabla 1 se muestran los reactivos necesarios de la reacción de la qPCR que se deben combinar con los primers específicos. Para asegurar que no ocurra una contaminación cruzada se desinfectó la cabina de flujo laminar con isopropanol y los materiales bajo luz UV antes de utilizarlos en la metodología. Los ensayos se realizaron con el Taqman Genotyping Assays, el cual está compuesto por sondas TaqMan prediseñadas y validadas por la casa comercial (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA).

Tabla 1. *Mix Para la Reacción*

Reactivo	X1	Xx (x es igual al número de muestras)
Master Mix	5µl	5µl*x
TaqMan Mix	0,5µl	0,5µl*x
Agua	2,5µl	2,5µl*x
Total	8µl	8µl*x

Nota. Al realizar los cálculos para la cantidad de muestras se incluye una extra para compensar el volumen que se pierde al pipetear

A partir del Mix para la reacción se añaden 8µl por cada pozo en la placa óptica de reacción de 96 pozos y se completa a un volumen de 10µl añadiendo 2µ de DNA de cada muestra a evaluar en el pocillo correspondiente; los pozos se sellan apropiadamente con sus respectivas tapas y se centrifuga la placa para eliminar cualquier burbuja, cuando se observe que estas ya no estén presentes la placa estará lista para depositar en el termociclador. Los ciclos que lleva a cabo el termociclador Bio-Rad CFX96 (BioRad, Hercules, CA) (BioRad, Hercules, CA) se encuentran en la tabla 2, el protocolo se programó usando *Bio-Rad manager program*. En el macroproyecto se ha encontrado que *TCF4* se ha asociado a otros trastornos mentales, por ello se decidió genotipificar el SNP rs1452789, con las sondas [VIC/FAM] TGTGGACAATATCAGCAGATTAGA G[A/T]CAGTTTATAGAGCAGCTTCTCTAAA y así determinar el grado de asociación con TAG. La sonda VIC corresponde al alelo A y la

sonda FAM es el alelo T, con base a esto se realizó la discriminación alélica. En la figura 2 se muestra un ejemplo de estos resultados para los 3 genotipos.

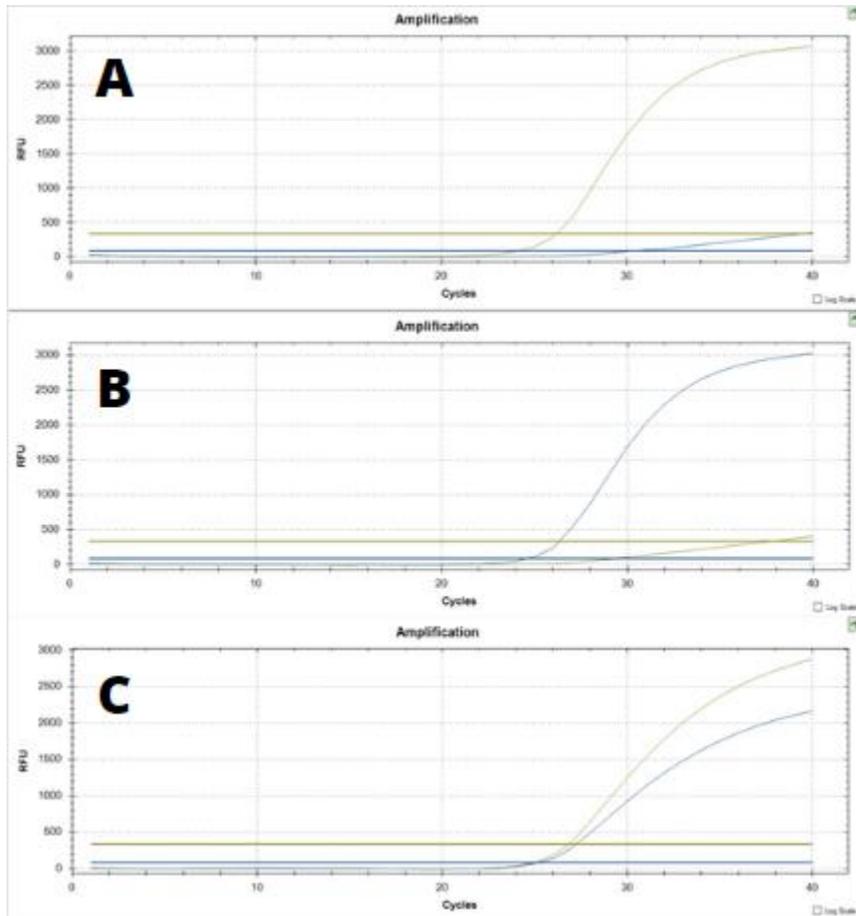


Figura 2. A) Una sola curva de color verde (sonda VIC) es un homocigoto A. B) Una sola curva de color azul (sonda FAM) es un homocigoto T. C) Una curva verde y una curva azul es un heterocigoto A/T.

Tabla 2. Protocolo

AmpliTaq Gold Activation	PCR (40 Ciclos)	
Hibridación	Desnaturalización	Extensión
10 minutos a 95 °C	15 segundos a 92 °C	90 segundos a 60 °C

2.6 Análisis estadístico por regresión lineal

Para el análisis estadístico se utilizó la herramienta SNPStats que utiliza la prueba estadística de regresión logística (Solé et al., 2006). Las variables se ingresaron en columna, la primera fila contiene el nombre de cada una, el SNP es la variable, la edad y el sexo como

covariables de tipo cuantitativa y categórica respectivamente, y el diagnóstico como la variable de respuesta de tipo categórico. Se seleccionó estadística descriptiva, el análisis del SNP único que abarca la frecuencia del alelo, frecuencia del genotipo, el Equilibrio de Hardy-Weinberg para verificar que la metodología de la genotipificación se estuviera realizando de forma correcta y la asociación del SNP con la respuesta. Se consideró $p < 0,05$ como valor de significancia para los resultados.

3 Resultados

3.1 Polimorfismos identificados y genes regulados por miRNA

Se identificaron 30 SNPs para el mir-494, 12 para el miR-155, 32 para el miR-144, 19 para el miR-17, 210 para el miR-663 y 22 para el miR-4505, a pesar de la gran cantidad de SNPs en los genes, no todos presentan un valor $MAF > 0$, en la tabla 3 se observan los alelos con un valor distinto a 0 con respecto al alelo silvestre.

Tabla 3. SNPs reportados en miRNASNP-v3 y sus respectivas frecuencias obtenidas en el NCBI a nivel global y Latinoamérica (LATAM)

microRNA	SNP ID	Ref/SNP	Alelo Silvestre \neq 0	MAF SNP
mir-494	rs1297430598	A/G	Global=0,999996 LATAM= 1,0	Global= 0,000004 LATAM= 0,0
	rs943020492	C/T	Global= 0,99997 LATAM= 0,998	Global= 0,0003 LATAM= 0,002
	rs1282621486	A/G	Global= 0,99993 LATAM= 1,0	Global= 0,00007 LATAM= 0,0
	rs1038771153	C/T	Global= 0,99986 LATAM= 1,0	Global= 0,00014 LATAM= 0,0
	rs751832247	C/T	Global= 0,99991 LATAM= 1,0	Global= 0,00009 LATAM= 0,0
	rs767364893	C/T	Global= 0,99994 LATAM= 0,998	Global= 0,00006 LATAM= 0,002
	rs538219412	G/A	Global= 0,99986 LATAM= 1,0	Global= 0,00014 LATAM= 0,0
mir-155	rs140021681	T/C	Global= 0,99993 LATAM= 1,0	Global= 0,0007 LATAM= 0,0
	rs377265631	A/G	Global= 0,99993 LATAM= 1,0	Global= 0,00007 LATAM= 0,0
mir-144	rs763390398	G/A	Global= 0,99995 LATAM= 1,0	Global= 0,00005 LATAM= 0,0
	rs774580747	G/A	Global= 0,99997 LATAM= 1,0	Global= 0,00003 LATAM= 0,0
	rs766077160	C/A, G, T	Global= 0,99997 LATAM= 1,0	Global= 0,00003 LATAM= 0,0
	rs1286986890	G/T	Global= 0,99995 LATAM= 1,0	Global= 0,00005 LATAM= 0,0
	rs370946973	A/C	Global= 0,99967 LATAM= 1,0	Global= 0,00033 LATAM= 0,0
mir-17	rs554398221	G/A	Global=0,99993 LATAM= 1,0	Global= 0,00007 LATAM= 0,0
	rs371185425	T/C, G	Global= 0,99997 LATAM= 1,0	Global= 0,00003 LATAM= 0,0

Se observa en la población global y latinoamericana, la ausencia de frecuencias mayores a 0.1, lo que indica una baja probabilidad de encontrar el alelo menor en la población bogotana de Colombia. Debido a la ausencia de frecuencias significativas en los datos anteriores para su genotipificación, se optó por la búsqueda de los ID de la tabla 3 y su anexo, por medio de las herramientas basadas en el desequilibrio del ligamiento, desafortunadamente

en estas bases de datos no están depositados los SNP encontrados anteriormente. El ejemplo de estas búsquedas se encuentra en el anexo.

La búsqueda bibliográfica de los polimorfismos de los miRNAs de interés permitió encontrar algunos polimorfismos con un MAF mayor a 0.1. Por ejemplo, en un estudio se encontró que el SNP rs767649 del mir-155 se asoció recientemente al cáncer de pulmón, diabetes mellitus y cáncer cervical (Assmann et al., 2017; Polina et al., 2019; S. Wang et al., 2016). La frecuencia a nivel global es de $A=0,06755$ y a nivel Latinoamérica $A=0,138$. El rs1547354 se encuentra asociado al mismo miRNA, pero no existe suficiente evidencia que lo relacione a alguna patología, su frecuencia a nivel global es de $A=0,02001$ y a nivel Latinoamérica $A=0,157$. El Rs9279 del miR-144 al igual que el miR-155 se ha visto implicado en la diabetes mellitus (Yan et al., 2021). Toda la información de los genes y sus polimorfismos fue encontrada en las bases del NCBI, en las que se aprecia que a nivel de Latinoamérica las frecuencias son significativamente mayores con respecto a otros SNP de la tabla 3, teniendo un valor de $MAF > 0,1$. Aunque los SNP encontrados en la literatura superaron el criterio principal, las sondas prediseñadas no se encuentran validadas, por esto no se pudo genotipificar ya que no se garantiza una correcta identificación de los SNP. Actualmente en el laboratorio se están diseñando primers para la identificación por un método de PCR convencional.

3.2 Genes diana de los microRNAs y sus implicaciones biológicas

Como se ha mencionado previamente, los miRNA son importantes reguladores de la expresión génica. Se encontró que miR-494, miR-155, miR-144 miR-17 y miR-663 regulan 1157, 1020, 285, 3867 y 36 genes respectivamente. Dentro de los genes diana identificados por medio de la herramienta TarBase V8 se encontró que el gen *TCF4* (factor de transcripción 4) está regulado por miR-155 y miR17. El gen que codifica para la proteína del mismo

nombre “es un factor de transcripción que se une al potenciador de inmunoglobulina Mu-E5/KE5-motif. Participa en el inicio de la diferenciación neuronal. Activa la transcripción uniéndose a la caja E (5'-CANNTG-3'). Se une a la caja E presente en el elemento iniciador del receptor 2 de somatostatina (SSTR2-INR) para activar la transcripción (por similitud)” (*TCF4 - Transcription Factor 4 - Homo Sapiens (Human) - TCF4 Gene & Protein, n.d.*).

A partir del análisis de enriquecimiento funcional de genes en ToppGene se encontró una gran cantidad de procesos asociados, donde se destaca la categoría de enfermedades y se observa diversos trastornos mentales. Dentro de las enfermedades que más se destacan en las cuales *TCF4* está relacionado, están los trastornos del neurodesarrollo, retraso global del desarrollo, retraso en el desarrollo, discapacidad intelectual, trastornos neurodegenerativos, depresión mental, desorden depresivo, trastorno generalizado del desarrollo. En las siguientes tablas (Tablas 4 a 7) se muestran las 5 categorías top junto a la cantidad de genes asociados y q-value FDR B&H. En el anexo se podrá observar todas las categorías significativas. Se encontró que el miR-494 en la mayoría de las categorías presentan un valor FDR D&H mayor a 0,05. El miR-4505 fue el único miRNA del que no se obtuvo datos análisis de enriquecimiento funcional de genes.

Tabla 4. *Análisis del enriquecimiento funcional para genes diana del miR-155*

Categorías significantes	Cantidad de genes	q-value FDR B&H
Enfermedades		
Leucemia infantil	164	1,73E-11
Leucemia	178	4,62E-11
Trastornos del neurodesarrollo	43	1,28E-02
Retraso global del desarrollo	51	1,35E-02
Retraso en el desarrollo (trastorno)	47	1,28E-02
Componente celular		
Cromosoma	181	1,06E-13
Complejo que contiene proteína nuclear	132	2,04E-10

Cromatina	129	5,58E-10
Complejo de transferasa	89	8,72E-09
Complejo regulador de la transcripción	65	1,85E-08
Proceso biológico		
Regulación positiva del proceso metabólico del ARN	190	3,00E-16
Regulación negativa del proceso metabólico compuesto que contiene nucleobase	177	3,00E-16
Regulación positiva del proceso biosintético de macromoléculas	198	2,02E-15
Proceso catabólico macromolécula celular	143	2,20E-15
Regulación negativa del proceso metabólico del ARN	163	1,40E-14
Función molecular		
Unión del factor de transcripción	96	6,26E-12
Actividad reguladora de la transcripción	184	4,46E-10
Unión a la cromatina	85	4,46E-10
Actividad del corregulador de la transcripción	70	4,19E-09
Unión a proteína quinasa	94	7,94E-08
Vías		
Expresión génica	176	2,53E-08
Efectores directos de p53	26	1,38E-04
Sistema Inmune Adaptativo	85	1,61E-04
Respuestas celulares al estrés	55	1,61E-04
Regulación de la señalización nuclear	18	1,61E-04
Fenotipo		
Anormalidad de la ubicación del globo	80	4,01E-04
Hipertelorismo	60	7,51E-04
Sarcoma	50	1,40E-03
Neoplasia del intestino grueso	22	2,97E-03
Anormalidad de la morfología calvarial	75	2,97E-03

Tabla 5. *Análisis del enriquecimiento funcional para genes diana del miR-17*

Categorías significantes	Hits	q-value FDR B&H
Enfermedades		
Discapacidad intelectual	299	9,47E-16
Trastornos neurodegenerativos	346	3,38E-15
Depresión mental	278	8,26E-05
Desorden depresivo	281	6,96E-05
Trastorno generalizado del desarrollo	167	8,33E-03
Componente celular		
Adhesión focal	159	1,02E-24

Unión de anclaje	265	1,02E-24
Unión célula-sustrato	161	1,02E-24
Complejo catalítico	410	1,18E-23
Cromosoma	450	5,22E-21
Proceso biológico		
Proceso catabólico de macromoléculas	442	9,07E-39
Regulación del ciclo celular	394	5,30E-37
Regulación del proceso catabólico	339	1,26E-35
Proceso del ciclo celular	446	1,43E-35
Proceso catabólico macromolécula celular	375	9,17E-35
Función molecular		
Unión del factor de transcripción	251	1,74E-28
Unión a proteína quinasa	275	2,47E-26
Unión a quinasa	298	2,47E-26
unión compleja que contiene proteínas	424	3,12E-25
Unión específica de dominio de proteína	254	5,84E-21
Vías		
Vía de señalización VEGFA-VEGFR2	158	8,78E-18
Vía de señalización de TGF-beta	70	9,01E-17
Tráfico de membranas	194	6,92E-15
Respuestas celulares al estrés	153	5,90E-14
Transporte mediado por vesículas	202	6,55E-14
Fenotipo		
Anormalidad de la pinna	163	3,87E-10
Anomalía del hueso de la extremidad	431	2,10E-09
Anormalidad de las extremidades	431	2,10E-09
Anormalidad del oído externo	226	4,33E-09
Anormalidad de la ubicación del globo	205	1,01E-08

Tabla 6. *Análisis del enriquecimiento funcional para genes diana del miR-144*

Categorías significantes	Hits	q-value FDR B&H
Enfermedades		
Cáncer de próstata refractario a hormonas	32	5,32E-06
Neoplasia maligna de endometrio	45	5,32E-06
Trastornos del desarrollo neurológico	18	8,23E-03
Trastornos neurodegenerativos	36	2,16E-02
Trastorno depresivo mayor	23	4,18E-02
Componente celular		
Cromosoma	54	1,03E-04

Gránulo de ribonucleoproteína citoplasmática	16	1,26E-04
Gránulo de ribonucleoproteína	16	1,52E-04
Gránulo de estrés citoplasmático	9	2,26E-04
Complejo RISC	9	2,35E-04
Proceso biológico		
Regulación negativa del proceso biosintético de macromoléculas celulares	64	8,68E-10
Regulación negativa del proceso biosintético de macromoléculas	64	8,68E-10
Regulación negativa del proceso biosintético	66	9,62E-10
Regulación positiva del proceso metabólico del ARN	65	1,96E-09
Regulación negativa del proceso biosintético celular	64	1,98E-09
Función molecular		
Unión del factor de transcripción	32	3,99E-05
Unión de ARN	56	4,70E-04
Actividad del corregulador de la transcripción	23	9,09E-04
Unión compleja que contiene proteínas	46	9,09E-04
Unión del factor de transcripción de unión a ADN específica de ARN polimerasa II	16	2,63E-03

Tabla 7. *Análisis del enriquecimiento funcional para genes diana del miR-663*

Categorías significantes	Hits	q-value FDR B&H
Enfermedades		
Enfermedad de Still de inicio juvenil	2	4,65E-02
Leucemia mieloblástica	2	4,65E-02
Leucemia infantil	2	4,65E-02
Retraso mental- ligado al X 61	1	4,65E-02
Linfoma - No Hodgkin – Familiar	5	4,65E-02
Función molecular		
Unión de histonas acetiladas con lisina	3	5,13E-04
Unión a proteínas dependiente de acetilación	3	5,13E-04
Actividad de nucleósido-trifosfatasa	9	1,60E-02
Actividad de pirofosfatasa	9	1,60E-02
Actividad hidrolasa- que actúa sobre los anhídridos de ácido	9	1,60E-02

3.3 Frecuencias alélicas y genotípicas en la población de estudio

Los ensayos se realizaron a partir de las muestras de 51 participantes mayores de 18 años, estos abarcan los controles y posibles casos de TAG. En la tabla 8 se encuentra la distribución de las 51 personas según el diagnóstico como la variable principal y el sexo como

covariable.

Tabla 8. Variable diagnóstica (n) y covariable: sexo (hombre y mujer)

	n	Hombre	Mujer
Todos los sujetos	51	15 (29%)	36 (71%)
Diagnóstico (Control)	26 (50,98%)	12 (46%)	14 (54%)
Diagnóstico (TAG)	25 (49,02%)	3 (12%)	22 (88%)

Se encontró que la frecuencia del alelo menor (T) es de 0,33. Los valores de las frecuencias alélicas en la tabla 9 se encuentran cercanos con la frecuencia reportada en el NCBI para este polimorfismo (*Rs1452789 RefSNP Report - DbSNP - NCBI*, n.d.). Solo 3 personas presentaron el alelo homocigoto T/T con una frecuencia muy baja. El genotipo homocigoto A/A es más frecuente en personas con rasgos de TAG mientras que el genotipo heterocigoto es más frecuente en el grupo control.

Tabla 9. Frecuencias alélicas y de genotipo de rs1452789 (n=51)

Alelo	Todos participantes		Diagnóstico (Control)		Diagnóstico (TAG)	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	N	Frecuencia
A	68	0,67	34	0,65	34	0,68
T	34	0,33	18	0,35	16	0,32
Genotipo						
A/A	20	0.39	9	0.35	11	0.44
A/T	28	0,55	16	0,62	12	0.48
T/T	3	0.06	1	0.04	2	0.08

Tabla 10. Prueba exacta de SNP para el equilibrio de Hardy-Weinberg (n=51)

	N11	N12	N22	N1	N2	valor p
Todos los sujetos	20	28	3	68	34	0.13
Diagnóstico (Control)	9	16	1	34	18	0.19
Diagnóstico (TAG)	11	12	2	34	16	1

3.4 Análisis de asociación

En el presente trabajo se realizó un análisis de asociación entre rs1452789 y los casos

de TAG, con el fin de identificar posibles genotipos de riesgo para el TAG. En la tabla 11 se muestra los tres modelos que se tuvieron en cuenta para realizar el análisis. El valor p en todos los modelos se encuentran por encima de 0,05, esto significa que no hay ninguna asociación significativa de las variables de los genotipos y el TAG.

Tabla 11. Asociación rs1452789 con la respuesta Diagnóstico (n=51, ajustado por Sexo+Edad) OR (Razón de momios) IC (Intervalo de confianza)

Modelo	Genotipo	Diagnóstico (Control)	Diagnóstico (TAG)	OR (95% CI)	valor p
Codominante	A/A	9 (34,6%)	11 (44%)	1.00	0,67
	A/T	16 (61,5%)	12 (48%)	0,79 (0,22-2,81)	
	T/T	1 (3,8%)	2 (8%)	2,57 (0,15-43,40)	
Dominante	A/A	9 (34,6%)	11 (44%)	1.00	0.84
	A/T-T/T	17 (65,4%)	14 (56%)	0,88 (0,25-3,06)	
Recesivo	A/A-A/T	25 (96,2%)	23 (92%)	1.00	0.42
	T/T	1 (3,8%)	2 (8%)	2,98 (0,19-45,62)	

4 Conclusiones

El principal objetivo en este estudio fue asociar polimorfismos de un solo nucleótido en genes de miRNA al trastorno de ansiedad generalizada en la población de Bogotá. Las principales estrategias para cumplir con este objetivo se basaron en el uso de bases de datos especializadas en el depósito de los miRNA, donde se identificaron SNP en todos los genes, y el uso de la PCR en tiempo real para la genotipificación de estos. La problemática de haber encontrado frecuencias muy bajas de los SNPs en los genes de miRNAs, condujo a que se realizara la genotipificación del SNP rs1452789 del gen *TCF4*, el cual es regulado por el miR-155 y miR17. Los análisis estadísticos mostraron que poseer el alelo T no presenta un factor de riesgo asociado al TAG. Hasta donde se sabe no se han realizado estudios a nivel mundial donde relacione a rs1452789 con alguna enfermedad, este es el primer estudio que intenta relacionarlo al TAG. Otros alelos de *TCF4* han demostrado ser factores de riesgo para la esquizofrenia (Forrest et al., 2014; Quednow et al., 2011, 2012). Valores de MAF pequeños no siempre suele estar mal, ya que cuando se seleccionan valores altos de MAF se disminuye la probabilidad de falsos positivos y sugiere una mayor presencia en la población a evaluar, mientras que un valor pequeño o variante rara, disminuye la población a individuos más cercanos, y también se podría asociar a enfermedades raras (la Cruz & Raska, 2014; Tabangin et al., 2009). Por otra parte, se encontró que los miRNA poseen una gran cantidad de genes diana implicados en diversos procesos biológicos y enfermedades como el gen *TCF4*. El identificar la interacción que tienen los miRNA con sus dianas que participen en vías metabólicas importantes en el cerebro ayuda a comprender a la patogenia de trastornos mentales (Xun Wang et al., 2018) y posibles biomarcadores específicos como el miR4505 y miR663 en el TAG (Chen et al., 2016). La producción de los miRNA se puede ver alterada por SNPs que puedan estar presentes en el gen, que al transcribirse modifica: la interacción con

los complejos proteicos encargados del procesamiento del pri-miRNA o el pre-miRNA, el transporte fuera del núcleo de este último y la unión de los genes diana con el miRNA al presentar el polimorfismo en la región semilla (Sun et al., 2009). Estudios de expresión han demostrado que la expresión aberrante de miR-155, miR494 y miR-144 se ha relacionado en situaciones de estrés académico y casos de trastorno de depresión mayor (Homorogan et al., 2021; Honda et al., 2013; Hung et al., 2019; Xiao Wang et al., 2015). Los estudios de expresión han resultado útiles para demostrar las implicaciones de los miRNA en trastornos mentales, pero solo se han realizado en poblaciones distantes a la latinoamericana. Hasta donde se sabe, en Colombia no se han realizado estudios donde se identifiquen y relacionen a los miRNA con el TAG. Los estudios destinados para la identificar la frecuencia del alelo menor en la población mundial se realizan por poblaciones muy grandes, Europa, África, Asia, Latinoamérica etc. Para algunas poblaciones como la latinoamericana el tamaño de la muestra suele ser pequeñas a comparación de otras, hay que tener en cuenta que esto es representativo de todo un continente. Se considera que sería más óptimo que las frecuencias pudieran estar dadas para cada país y no una población más general. La frecuencia de un alelo de una muestra pequeña para una población tan grande dificulta escoger un SNP de confianza para genotipificar, sobre todo si estos presentan un MAF bajo. La identificación y correlación de SNPs en genes de miRNA como factores de riesgo en trastornos mentales, es un área relativamente nueva y de gran interés por los efectos de los polimorfismos en estas moléculas pequeñas pero importantes, por la gran cantidad de miRNA que se han descubierto y el papel que desempeñan como reguladores epigenéticos incidiendo en procesos metabólicos. A futuro se requieren más estudios donde se disponga de mayor tamaño de la muestra de sujetos analizados en la población colombiana; también se requiere el análisis de otras variables que podrían influir entre la relación del rs1452789 del gen *TCF4* y el TAG.

Bibliografía

- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2014). PCR en tiempo real. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*, 175–202.
- Arango, D. O. D., Subdirecto, R. V. R., María Fernanda De La Ossa Archila, J., Ortiz González Director Operativo DIMCE, M., Angélica Arrieta Romero, M., Alfonso Díaz Cruz, D., Andrea García Rojas, K., Felipe Gómez González Profesional especializado - DIMCE Elaboración Natalia Alonso Ospina, D., Lizeth Chávez, K., Alexander Ramírez, C., Esteban Lara, N., Coral Director Técnico DIMPE, H., & Vega Directora Técnica DCD Diseño diagramación Gabriela Wiesner Montaña Cesar Rojas Lozano Brandon Steve Rojas Guerra Portada Francisco Viveros, A. (n.d.). *DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA-DANE*.
- Assmann, T. S., Duarte, G. C. K., Brondani, L. A., de Freitas, P. H. O., Martins, É. M., Canani, L. H., & Crispim, D. (2017). Polymorphisms in genes encoding miR-155 and miR-146a are associated with protection to type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, 54(5), 433–441.
- Ávila-Moreno, F., Urrea, F., & Ortiz-Quintero, B. (2011). MicroRNAs en el diagnóstico y prognosis del cáncer pulmonar. *Revista de Investigación Clínica*, 63(5), 516–535.
- Brzezinski, M., Michelotti, G. A., & Schwinn, D. A. (2006). Genomics and proteomics. *Foundations of Anesthesia*, 71–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-03707-5.50011-5>
- Caratachea, M. A. C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 20(3), 213–221.
- Chen, S., Sun, X., Niu, W., Kong, L., He, M., Fan, H., Li, W., Zhong, A., Zhang, L., & Lu, J. (2016). Correlation between the level of microRNA expression in peripheral blood

mononuclear cells and symptomatology in patients with generalized anxiety disorder.

Comprehensive Psychiatry, 69, 216–224.

de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., & Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6249.

Forero, D. A., Vélez-van-Meerbeke, A., Deshpande, S. N., Nicolini, H., & Perry, G. (2014). Neuropsychiatric genetics in developing countries: Current challenges. *World Journal of Psychiatry*, 4(4), 69.

Forrest, M. P., Hill, M. J., Quantock, A. J., Martin-Rendon, E., & Blake, D. J. (2014). The emerging roles of TCF4 in disease and development. *Trends in Molecular Medicine*, 20(6), 322–331.

Gómez-Restrepo, C., Tamayo-Martínez, N., Buitrago, G., Guarnizo-Herreño, C. C., Garzón-Orjuela, N., Eslava-Schmalbach, J., de Vries, E., Rengifo, H., Rodríguez, A., & Rincón, C. J. (2016). Violencia por conflicto armado y prevalencias de trastornos del afecto, ansiedad y problemas mentales en la población adulta colombiana. *Revista Colombiana de Psiquiatria*, 45, 147–153.

Homorogan, C., Enatescu, V. R., Nitusca, D., Marcu, A., Seclaman, E., & Marian, C. (2021). Distribution of microRNAs associated with major depressive disorder among blood compartments. *Journal of International Medical Research*, 49(4), 03000605211006633.

Honda, M., Kuwano, Y., Katsuura-Kamano, S., Kamezaki, Y., Fujita, K., Akaike, Y., Kano, S., Nishida, K., Masuda, K., & Rokutan, K. (2013). Chronic academic stress increases a group of microRNAs in peripheral blood. *PloS One*, 8(10), e75960.

Hung, Y.-Y., Wu, M.-K., Tsai, M.-C., Huang, Y.-L., & Kang, H.-Y. (2019). Aberrant expression of intracellular let-7e, miR-146a, and miR-155 correlates with severity of

depression in patients with major depressive disorder and is ameliorated after antidepressant treatment. *Cells*, 8(7), 647.

Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., Kanellos, I., Papadimitriou, D., Kavakiotis, I., Maniou, S., Skoufos, G., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2018). DIANA-TarBase v8: A decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D239–D245. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1141>

la Cruz, O., & Raska, P. (2014). Population structure at different minor allele frequency levels. *BMC Proceedings*, 8(1), 1–5.

Las cifras de la salud mental en pandemia. (n.d.). Retrieved April 3, 2022, from <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Las-cifras-de-la-salud-mental-en-pandemia.aspx>

Liu, C.-J., Fu, X., Xia, M., Zhang, Q., Gu, Z., & Guo, A.-Y. (2021). miRNASNP-v3: a comprehensive database for SNPs and disease-related variations in miRNAs and miRNA targets. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1276–D1281. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa783>

López, A. B. (1998). Trastorno de ansiedad generalizada. *Recuperado de Http://Diposit. Ub. Edu/Dspace/Bitstream/2445/357/1/116. Pdf*.

Martínez, N. T., Rodríguez, C. J. R., de Santacruz, C., Bautista, N. B., Collazos, J., & Gómez-Restrepo, C. (2016). Problemas mentales, trastornos del afecto y de ansiedad en la población desplazada por la violencia en Colombia, resultados de la Encuesta Nacional de Salud Mental 2015. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 45, 113–118.

Murphy, C. P., & Singewald, N. (2019). Role of microRNAs in anxiety and anxiety-related disorders. In *Behavioral Neurogenomics* (pp. 185–219). Springer.

Payarés, N. V., & Mancilla, L. I. (2012). *ADN de alta calidad a partir de sangre total*

almacenada por largo tiempo para amplificación por PCR.

- Polina, E. R., Oliveira, F. M., Sbruzzi, R. C., Crispim, D., Canani, L. H., & Santos, K. G. (2019). Gene polymorphism and plasma levels of miR-155 in diabetic retinopathy. *Endocrine Connections*, 8(12), 1591–1599.
- Posada-Villa, J., Buitrago-Bonilla, J., Medina-Barreto, Y., & Rodríguez-Ospina, M. (2006). Trastornos de ansiedad según distribución por edad, género, variaciones por regiones, edad de aparición, uso de servicios, estado civil y funcionamiento/discapacidad según el Estudio Nacional de Salud Mental-Colombia. *Nova*, 4(6).
- Quednow, B. B., Brinkmeyer, J., Mobascher, A., Nothnagel, M., Musso, F., Gründer, G., Savary, N., Petrovsky, N., Frommann, I., Lennertz, L., & others. (2012). Schizophrenia risk polymorphisms in the TCF4 gene interact with smoking in the modulation of auditory sensory gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6271–6276.
- Quednow, B. B., Ettinger, U., Mössner, R., Rujescu, D., Giegling, I., Collier, D. A., Schmechtig, A., Kühn, K.-U., Möller, H.-J., Maier, W., & others. (2011). The schizophrenia risk allele C of the TCF4 rs9960767 polymorphism disrupts sensorimotor gating in schizophrenia spectrum and healthy volunteers. *Journal of Neuroscience*, 31(18), 6684–6691.
- Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C., & Fragoso, J. M. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Medica de Mexico*, 149(2), 220–228.
- rs1452789 RefSNP Report - dbSNP - NCBI*. (n.d.). Retrieved April 18, 2022, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1452789>

Salud Mental Encuesta Nacional de 2 015. (n.d.).

single nucleotide polymorphism / SNP | Learn Science at Scitable. (n.d.). Retrieved February

18, 2022, from <https://www.nature.com/scitable/definition/snp-295/>

Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R., & Moreno, V. (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 22(15), 1928–1929.

Sun, G., Yan, J., Noltner, K., Feng, J., Li, H., Sarkis, D. A., Sommer, S. S., & Rossi, J. J. (2009). SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *Rna*, 15(9), 1640–1651.

Tabangin, M. E., Woo, J. G., & Martin, L. J. (2009). The effect of minor allele frequency on the likelihood of obtaining false positives. *BMC Proceedings*, 3(7), 1–4.

TCF4 - Transcription factor 4 - Homo sapiens (Human) - TCF4 gene & protein. (n.d.).

Retrieved April 21, 2022, from <https://www.uniprot.org/uniprot/P15884>

ToppFun - Functional Enrichment. (n.d.). Retrieved April 10, 2022, from

<https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>

Wang, S., Cao, X., Ding, B., Chen, J., Cui, M., Xu, Y., Lu, X., Zhang, Z., He, A., & Jin, H. (2016). The rs767649 polymorphism in the promoter of miR-155 contributes to the decreased risk for cervical cancer in a Chinese population. *Gene*, 595(1), 109–114.

Wang, Xiao, Sundquist, K., Hedelius, A., Palmér, K., Memon, A. A., & Sundquist, J. (2015). Circulating microRNA-144-5p is associated with depressive disorders. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 1–8.

Wang, Xun, Wang, B., Zhao, J., Liu, C., Qu, X., & Li, Y. (2018). MiR-155 is involved in major depression disorder and antidepressant treatment via targeting SIRT1. *Bioscience Reports*, 38(6).

Yan, Y.-X., Xiao, H.-B., Zhang, J., Wang, S., Dong, J., & Wu, L.-J. (2021). Pri-miR-144

rs9279 is associated with type 2 diabetes and regulation of stress response. *Journal of Cellular Physiology*, 236(1), 561–569.