



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Bases biológicas de la fisiopatología y la farmacología del trastorno obsesivo-compulsivo de inicio en la infancia y la adolescencia

Influencia de la genética y la desregulación inmunológica

Natalia Rodríguez Ferret

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Bases biológicas de la fisiopatología y la farmacología del trastorno obsesivo-compulsivo de inicio en la infancia y la adolescencia

Influencia de la genética y la desregulación inmunológica

Natalia Rodríguez Ferret

Dirigida por:
Patricia Gassó Astorga
Astrid Morer Liñán

Barcelona, 2018





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Bases biológicas de la fisiopatología y la farmacología del trastorno
obsesivo-compulsivo de inicio en la infancia y la adolescencia**
Influencia de la genética y la desregulación inmunológica

Tesis presentada por:

Natalia Rodríguez Ferret

Para optar al título de doctor por la Universitat de Barcelona

Dirigida por:

Dra. Patricia Gassó Astorga

Dra. Astrid Morer Liñán

Programa de Doctorado de Medicina e Investigación Traslacional
Departamento de Fundamentos Clínicos
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
Universitat de Barcelona
2018

© Natalia Rodríguez Ferret

Barcelona (2018)

Impresión y encuadernación: Alfombra Copistería

*A mi familia.
Por todo.
Mis logros son vuestros.*

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Amalia Lafuente, por haberme permitido trabajar en su equipo. Gracias por su confianza durante todo este tiempo, por su ayuda y por todas las oportunidades ofrecidas, sin las cuales todo esto no habría sido posible.

A la Dra. Patricia Gassó, directora de esta tesis. Por su tenacidad y dedicación y por todos sus consejos a lo largo de esta experiencia. Gracias por darme la confianza necesaria para seguir adelante en todos los proyectos, por iniciar cada una de las etapas con una sonrisa y un entusiasmo contagiosos y por ofrecerme su apoyo en los momentos más difíciles. Siempre es un placer trabajar contigo.

A la mi segunda directora, la Dra. Astrid Morer, por ayudarme con la faceta más clínica del TOC y transmitirme su entusiasmo por la hipótesis inmunitaria del trastorno. Gracias por sus ideas, por su positivismo y por su ayuda, a pesar de la carga de trabajo que la caracteriza.

Gracias también al Dr. Sergi Mas, por su dedicación y ayuda incondicionales. Por las horas invertidas y su preocupación por sacar los proyectos adelante. Por dejarme aprender con él durante este tiempo. Sin su apoyo y su conocimiento este trabajo no habría sido posible.

A todos los profesionales del Servicio de Psiquiatría y Psicología Infantil y Juvenil y del Servicio de Inmunología del Hospital Clínic de Barcelona, especialmente a la Dra. Luisa Lázaro, al Dr. Carles Serra y a Azucena, por su buena predisposición y asesoramiento en los estudios de esta tesis.

A todos los pacientes y familias que aceptaron participar en este proyecto, sin los cuales nada de esto habría sido posible.

A los miembros del equipo (Daniel, Tere i Albert), con quien he compartido estos años en el laboratorio. Gracias por su ayuda y su compañía, que han hecho que este camino sea más fácil. También me gustaría agradecer a Gisela, por los buenos ratos, por sus constantes ánimos y por estar siempre dispuesta a ayudar.

Al resto de miembros de la Unidad de Farmacología de la Facultad de Medicina y de la Unidad de Esquizofrenia del Hospital Clínic de Barcelona, por haber contribuido de algún modo a mi formación predoctoral.

A los miembros del departamento de Cirugía Neurológica de la UCSF, especialmente al Dr. Wiencke, por permitirme vivir una experiencia inolvidable y enriquecedora tanto desde el punto de vista profesional como personal.

A mis amigas, especialmente a Pat, a Pati, a Ana y a Mireia, por estar ahí siempre que las necesito haciendo la vida más fácil y divertida. Gracias por su paciencia, por su interés en lo que hago y por hacerme ser mejor persona.

A Cris, por revolucionar mi vida con su sentido del humor y su locura. Por estar a mi lado, acompañándome en este camino y enseñándome a crecer cada día un poco más. Por estos años compartidos y por todos los proyectos en común que quedan por venir. Gracias también a su familia, por acogerme y hacerme sentir como un miembro más.

Finalmente, a mi familia, por todo su apoyo incondicional, por su paciencia, por creer en mí y quererme siempre. A mis padres, por habérmelo dado todo y hacerme ser quien soy, por su confianza ciega y su ayuda constante. Gracias por estar a mi lado. A Nuria, por ser la mejor hermana que uno podría querer, por su capacidad de ver siempre la mejor versión de mí misma y por estar ahí siempre que necesito. A mi abuela, por su energía y sensibilidad, por su amor infinito y por estar siempre orgullosa a pesar de no entender demasiado lo que hago.

A todos vosotros, gracias.

*¿Y si en vez de juzgarnos por nuestra imperfección
recordáramos que la perfección que nos rodea
no es más que una ficción?
Vivir a todo color, incluido el negro.*

Nuria Pérez Paredes

ÍNDICE

<i>Abreviaturas y acrónimos</i>	13
<i>Prefacio</i>	15
<i>Justificación de la tesis</i>	19
<i>Resumen</i>	20
<i>Abstract</i>	21
INTRODUCCIÓN.....	23
1.1 Epidemiología y características clínicas del trastorno obsesivo-compulsivo de inicio en la infancia y la adolescencia	25
1.2 Etiopatogenia del TOC	30
1.2.1 Papel de la genética en el TOC de inicio en la infancia y la adolescencia	34
1.2.2 Papel del sistema inmunitario en el TOC de inicio en la infancia y la adolescencia	36
1.3 Tratamiento del TOC de inicio en la infancia y la adolescencia.....	45
1.3.1 Farmacogenética de la fluoxetina	48
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
2.1 Hipótesis	57
2.2 Objetivos.....	59
MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1 Participantes	63
3.2 Evaluación clínica	66
3.3 Caracterización de monocitos en pacientes con TOC de inicio en la infancia y la adolescencia (<i>Estudio 2</i>)	67
3.3.1 Evaluación de las poblaciones de monocitos mediante citometría de flujo.....	67
3.3.2 Cultivo primario de monocitos y determinación de su funcionalidad	69
3.4 Estudio de marcadores genéticos y epigenéticos del TOC y de la respuesta a fluoxetina (<i>Estudios 1, 3 y 4</i>).....	70
3.5 Análisis estadístico.....	73
RESULTADOS	77
4.1 Estudio 1. Genética HLA.....	79
4.2 Estudio 2. Caracterización de monocitos.....	89
4.3 Estudio 3. Farmacogenética de la fluoxetina 1	112
4.4 Estudio 4. Farmacogenética de la fluoxetina 2.....	133

DISCUSIÓN	147
5.1 Desregulación inmunológica en el TOC de inicio en la infancia y la adolescencia	149
5.2 Marcadores genéticos y epigenéticos de la respuesta clínica a fluoxetina en niños y adolescentes	155
5.3 Limitaciones y puntos fuertes	159
CONCLUSIONES	163
6.1 Conclusiones	165
6.2 Conclusions	166
IMPLICACIONES CLÍNICAS Y LÍNEAS FUTURAS.....	167
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171
ANEXOS.....	191
9.1 Anexo 1	193
9.2 Anexo 2	195
9.3 Anexo 3	196
9.4 Anexo 4	197
9.5 Anexo 5	198
9.6 Anexo 6	199
9.7 Anexo 7	200

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AIC	Criterio de Información de Akaike (<i>Akaike Information Criterion</i>)
ADA	Adenosina Desaminasa
ARN	Ácido Ribonucleico
AQP9	Acuaporina 9
CAPNS1	Subunidad pequeña 1 de la calpaína (<i>Calpain Small Subunit 1</i>)
CCA	Córtex Cingulado Anterior
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CCL3L1	<i>C-C motif chemokine ligand 3 like 1</i>
CD14	<i>Cluster of Differentiation 14</i>
CD16	<i>Cluster of Differentiation 16</i>
CDI	<i>Children's Depression Inventory</i>
CETC	Circuito Cortico-Estriado-Tálamo-Cortical
CGAS	<i>Children's Global Assessment Scale</i>
CGI-I	<i>Clinical Global Impression-Improvement</i>
CGI-S	<i>Clinical Global Impression-Severity</i>
COF	Córtex Orbitofrontal
CY-BOCS	<i>Children's Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale</i>
DEX	Dexametasona
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition</i>
DSM-5	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GABA	Ácido γ -Aminobutírico
GABHS	Estreptococo β -hemolítico del grupo A (<i>Group A β-Haemolytic Sptretococcal</i>)
GAF	<i>Global Assessment of Functioning</i>
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GPe	Globo Pálido Externo
GPI	Globo Pálido Interno
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i>
HLA	Antígeno Leucocitario Humano (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
HLA-DQB1	<i>Human Leukocyte Antigen-DQ Beta 1 chain</i>
HLA-DRB1	<i>Human Leukocyte Antigen-DR Beta 1 chain</i>
HPA	Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal
HTR1B	Receptor de Serotonina 1B (<i>5-hydroxytryptamine receptor 1B</i>)

IDO1	Indolamina 2,3-dioxigenasa 1
IFI30	tiol-reductasa lisosomal
IL	Interleuquina
ISRS	Inhibidores Selectivos de la Reptación de Serotonina
K-SADS-PL	<i>Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version</i>
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacárido
MAF	Frecuencia Alélica Mínima (<i>Minor Allele Frequency</i>)
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
NK	<i>Natural Killer</i>
OCI-CV	<i>Obsessive–Compulsive Inventory-Child Version</i>
PANDAS	<i>Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections</i>
PANS	<i>Pediatric Acute-Onset Neuropsychiatric Syndrome</i>
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SCARED	<i>Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders</i>
SEM	Error Estándar de la Media (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SERT	Transportador de Recaptación de Serotonina
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Polimorfismo de una sola base (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SNr	Sustancia Nigra
ST	Síndrome de Tourette
TAG	Trastorno de Ansiedad Generalizada
TCC	Terapia Cognitivo Conductual
TDAH	Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad
TDM	Trastorno Depresivo Mayor
TEA	Trastorno del Espectro Autista
TFBS	Lugares de Unión a Factores de Transcripción (<i>Transcription Factor Binding Site</i>)
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante beta (<i>Transforming Growth Factor beta</i>)
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
TOC	Trastorno Obsesivo-Compulsivo
TPH2	Triptófano Hidroxilasa (<i>Tryptophan 5-Hydroxylase 2</i>)

PREFACIO

La presente tesis doctoral es el resultado del trabajo realizado por la doctoranda en la unidad de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona dentro del Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional. Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda de personal investigador predoctoral en formación (APIF) de la Universitat de Barcelona así como a la financiación obtenida del Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (PI13/01767, PI10/01965), FEDER-Unión Europea y la Fundación Alicia Koplowitz. Los grupos de investigación participantes obtuvieron ayuda por parte de la “Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca” (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya (2014 SGR 489 “Grupo de Psiquiatría y Psicología Infantil” y 2014 SGR 436 “Grupo de Farmacología y Farmacogenética”).

A continuación se enumeran los estudios que conforman la presente tesis doctoral. Los resultados de estos estudios se han publicado en revistas de alto impacto en el campo de la farmacología y la psiquiatría.

Estudio 1 (Genética HLA)

Título: **Human-leukocyte antigen class II genes in early-onset obsessive-compulsive disorder.**

Autores: **Rodríguez N**, Morer A, González-Navarro EA, Gassó P, Boloc D, Serra-Pagès C, Lafuente A, Lazaro L, Mas S.

Revista: The World Journal of Biological Psychiatry

Año de publicación: 2017

Volumen y Páginas: 31: 1-7.

Índice de impacto: 3.658

Cuartil y área: 2º Cuartil del área científica *Psychiatry* (Posición 37 de 142)

Estudio 2 (Caracterización de monocitos)

Título: **Inflammatory dysregulation of monocytes in pediatric patients with obsessive-compulsive disorder**

Autores: **Rodríguez N**, Morer A, González-Navarro EA, Serra-Pages C, Boloc D, Torres T, García-Cerro S, Mas S, Gassó P, Lázaro L.

Revista: Journal of Neuroinflammation

Año de publicación: 2017

Volumen y Páginas: 14: 261

Índice de impacto: 5.102

Cuartil y área: 1^{er} Cuartil del área científica *Neurosciences* (Posición 40/259)

Estudio 3 (*Farmacogenética de la fluoxetina 1*)

Título: **Pharmacogenetic study focused on fluoxetine pharmacodynamics in children and adolescent patients: impact of the serotonin pathway.**

Autores: Mas S, Blázquez A, **Rodríguez N**, Boloc D, Lafuente A, Arnaiz JA, Lázaro L, Gassó P.

Revista: Pharmacogenetics and Genomics

Año de publicación: 2016

Volumen y Páginas: 26: 487-496.

Índice de impacto: 2.184

Cuartil y área: 3^{er} Cuartil del área científica *Pharmacology & Pharmacy* (Posición 152 de 256)

Estudio 4 (*Farmacogenética de la fluoxetina 2*)

Título: **Epigenetic and genetic variants in the *HTR1B* gene and clinical improvement in children and adolescents treated with fluoxetine.**

Autores: Gassó P*, **Rodríguez N***, Blázquez A, Monteagudo A, Boloc D, Plana MT, Lafuente A, Lázaro L, Arnaiz JA, Mas S. *Igual contribución.

Revista: Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

Año de publicación: 2017

Volumen y Páginas: 31: 1-7.

Índice de impacto: 4.187

Cuartil y área: 1^{er} Cuartil del área científica *Pharmacology & Pharmacy* (Posición 41 de 256)

Aunque no forma parte del presente trabajo de tesis, a continuación se expone la producción científica que se ha derivado de mi actividad investigadora en la unidad de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona.

1. Boloc D, **Rodríguez N**, Gassó P, Abril JF, Bernardo M, Lafuente A, Mas S. SiNoPsis: Single Nucleotide Polymorphisms selection and promoter profiling. *Bioinformatics*. 2017. doi: 10.1093/bioinformatics/btx570.

Índice de Impacto: 7.307

1^{er} Cuartil del área *Biochemical Research Methods*

2. Gassó P, Mas S, **Rodríguez N**, Boloc D, García-Cerro S, Bernardo M, Lafuente A, Parellada E. Microarray gene-expression study in fibroblast and lymphoblastoid cell lines from antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia patients. *J Psychiatr Res*. 2017; 95: 91-101. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.08.003.

Índice de Impacto: 4.183

1^{er} cuartil del área científica *Psychiatry*

3. Gassó P, **Rodríguez N**, Boloc D, Blázquez A, Torres T, Gortat A, Plana MT, Lafuente A, Mas S, Arnaiz JA, Lázaro L. Association of regulatory *TPH2* polymorphisms with higher reduction in depressive symptoms in children and adolescents treated with fluoxetine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017; 77: 236-240. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.04.031.

Índice de Impacto: 4.187

1^{er} cuartil del área científica *Pharmacology & Pharmacy*

4. Gassó P, Sánchez-Gistau V, Mas S, Sugranyes G, **Rodríguez N**, Boloc D, de la Serna E, Romero S, Moreno D, Moreno C, Díaz-Caneja CM, Lafuente A, Castro-Fornieles J. Association of *CACNA1C* and *SYNE1* in offspring of patients with psychiatric disorders. *Psychiatry Res*. 2016; 245: 427-435. doi: 10.1016/j.psychres.2016.08.058.

Índice de Impacto: 2.528

2^o cuartil del área científica *Psychiatry*

5. Mas S, Gassó P, Boloc D, **Rodríguez N**, Mármol F, Sánchez J, Bernardo M, Lafuente A. Network analysis of gene expression in mice provides new evidence of involvement of the mTOR pathway in antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms. *Pharmacogenomics J*. 2016; 16: 293-300. doi: 10.1038/tpj.2015.48.

Índice de Impacto: 3.815

1^{er} cuartil del área científica *Pharmacology & Pharmacy*

6. Gassó P, Pagerols M, Flamarique I, Castro-Fornieles J, **Rodríguez N**, Mas S, Curran S, Aitchison K, Santosh P, Lafuente A; Stop Consortium. The effect of age on DNA concentration from whole saliva: implications for the standard isolation method. *Am J Hum Biol*. 2014; 26: 859-62. doi: 10.1002/ajhb.22593.

Índice de Impacto: 1.700

1^{er} cuartil del área científica *Biology*

7. Gassó P, **Rodríguez N**, Mas S, Pagerols M, Blázquez A, Plana MT, Torra M, Lázaro L, Lafuente A. Effect of *CYP2D6*, *CYP2C9* and *ABCB1* genotypes on fluoxetine plasma concentrations and clinical improvement in children and adolescent patients. *Pharmacogenomics J*. 2014 Oct;14(5):457-62. doi: 10.1038/tpj.2014.12.

Índice de Impacto: 4.229

1^{er} cuartil del área científica *Pharmacology & Pharmacy*

8. Mas S, Pagerols M, Gassó P, Ortiz A, **Rodríguez N**, Morer A, Plana MT, Lafuente A, Lazaro L. Role of *GAD2* and *HTR1B* genes in early-onset obsessive-compulsive disorder: results from transmission disequilibrium study. *Genes Brain Behav.* 2014; 13: 409-17. doi: 10.1111/gbb.12128.

Índice de Impacto: 3.661

1^{er} cuartil del área científica *Behavioral Sciences*

JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

El trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) es una de las enfermedades neuropsiquiátricas más comunes y una de las que conlleva una mayor afectación funcional. En un elevado porcentaje de pacientes la aparición de los síntomas se da durante la infancia y la adolescencia. Estos pacientes presentan un mayor riesgo de cronificación y un peor pronóstico. En la población pediátrica la disfunción social, familiar y académica causada por la enfermedad puede conllevar un empeoramiento significativo de la calidad de vida a largo plazo. Por ello, es crucial realizar un tratamiento precoz que permita un control eficaz de los síntomas. A día de hoy, la fluoxetina representa el principal tratamiento farmacológico de la enfermedad. A pesar de su eficacia, entre un 30 y un 50% de los pacientes no responden adecuadamente. En consecuencia, resulta primordial llevar a cabo estudios que permitan predecir la respuesta farmacológica con el objetivo de realizar terapias más personalizadas que sean más eficaces y más seguras.

Además, dada la escasez de fármacos efectivos en el tratamiento del TOC y dado que la etiología de esta enfermedad es aún desconocida, es importante esclarecer sus mecanismos etiopatogénicos con el fin de identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de nuevos fármacos eficaces para estos pacientes.

Por ello, en esta tesis doctoral se pretende, por un lado, profundizar en los mecanismos etiopatogénicos del TOC, concretamente en las alteraciones existentes a nivel del sistema inmunitario, y por el otro identificar factores genéticos que permitan predecir la respuesta farmacológica a la fluoxetina. Los resultados obtenidos en esta tesis han sido publicados en revistas científicas de alto impacto en el campo de la psiquiatría y la farmacología y aportan información novedosa y relevante al conocimiento de la fisiopatología y la farmacología del TOC.

RESUMEN

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) de inicio en la infancia y la adolescencia es un trastorno psiquiátrico con una prevalencia de alrededor del 1-3%, caracterizado por la presencia de obsesiones y compulsiones recurrentes que generan una elevada ansiedad y malestar en el paciente. Además, el debut temprano de estos pacientes conlleva un mayor riesgo de cronificación y un peor pronóstico. El conocimiento actual sobre los factores de riesgo y los mecanismos etiopatogénicos del TOC continúa siendo limitado. Una de las hipótesis más recientes plantea que las alteraciones en el sistema inmunitario podrían estar implicadas en el desarrollo de esta enfermedad. En cuanto al abordaje terapéutico, el principal tratamiento farmacológico utilizado en estos pacientes es la fluoxetina. A pesar de su eficacia en el control de la sintomatología obsesivo-compulsiva, existe una elevada variabilidad interindividual en la respuesta terapéutica.

La presente tesis doctoral tiene como objetivo profundizar en las bases biológicas implicadas en la susceptibilidad a padecer TOC de inicio en la infancia y la adolescencia, centrándose en el papel que juegan los factores genéticos y las alteraciones inmunológicas, con el objetivo final de identificar nuevas dianas terapéuticas. Además, se pretende evaluar la influencia de los factores genéticos en la respuesta al tratamiento con fluoxetina en niños y adolescentes, con el fin de mejorar el tratamiento farmacológico actual.

Los resultados obtenidos indican la presencia de alteraciones en el sistema inmunitario a distintos niveles en los niños y adolescentes con TOC. En concreto, estos pacientes presentan una frecuencia superior de determinados alelos HLA de clase II, así como una mayor concentración de monocitos circulantes proinflamatorios en comparación con individuos control. Además, estos monocitos en cultivo liberan mayores cantidades de citoquinas proinflamatorias y presentan un perfil de expresión en genes relacionados con el sistema inmunitario distinto al de los controles. En cuanto a la farmacogenética de la fluoxetina, variantes genéticas y epigenéticas en genes relacionados con el sistema serotoninérgico (*HTRB1* y *TPH2*) parecen tener un efecto importante en la respuesta terapéutica.

Los hallazgos obtenidos proporcionan nuevas evidencias sobre la fisiopatología y la farmacología del TOC, útiles para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y para la mejora del tratamiento farmacológico actual.

ABSTRACT

Obsessive-compulsive disorder (OCD) in childhood and adolescence is a psychiatric disorder with a prevalence of around 1-3%, characterized by the presence of recurrent obsessions and compulsions that generate high anxiety and discomfort in the patient. In addition, the early debut of these patients entails a greater risk for chronicity and a worse prognosis. Current knowledge about the risk factors and the etiopathogenic mechanisms of OCD is still limited. One of the most recent hypotheses proposes that alterations in the immune system could be involved in the development of this disease. Regarding the therapeutic approach, the main pharmacological treatment used in these patients is fluoxetine. Despite its efficacy in the control of obsessive-compulsive symptoms, there is a high interindividual variability in the clinical response.

The present doctoral thesis aims to deepen the biological basis involved in the susceptibility to develop OCD in childhood and adolescence, focusing on the role played by genetic factors and immune alterations, with the ultimate goal of identifying new therapeutic targets. In addition, we evaluated the influence of genetic factors on fluoxetine response in children and adolescents, in order to improve the current pharmacological treatment.

The results obtained indicate the presence of immune alterations at different levels in children and adolescents with OCD. Specifically, these patients showed a higher frequency of certain HLA class II alleles, as well as a higher concentration of circulating proinflammatory monocytes compared to control individuals. In addition, the cultured monocytes from OCD patients released higher amounts of proinflammatory cytokines and showed different expression profiles in genes related to the immune system compared to those from controls. Regarding the pharmacogenetics of fluoxetine, genetic and epigenetic variants in genes related to the serotonin system (*HTRB1* and *TPH2*) seem to have an important effect on the therapeutic response.

These findings provide new evidence on the pathophysiology and pharmacology of OCD, useful for the development of new therapeutic strategies and for the improvement of current pharmacological treatment.

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología y características clínicas del trastorno obsesivo-compulsivo de inicio en la infancia y la adolescencia

El trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) es un trastorno neuropsiquiátrico común que afecta alrededor del 1-3% de la población mundial (Ruscio et al., 2010). Se caracteriza por la presencia de obsesiones recurrentes que impulsan al paciente a llevar a cabo una serie de rituales o de compulsiones. Las obsesiones se definen como pensamientos, impulsos o imágenes repetitivas y persistentes, que se presentan de forma intrusiva e indeseada y que causan una marcada ansiedad o angustia en el paciente. Las compulsiones, en cambio, consisten en la realización de comportamientos repetitivos o de actos mentales de carácter recurrente cuyo propósito no es obtener placer o gratificación sino prevenir o reducir la ansiedad, el malestar o los eventos temidos en las obsesiones. Este conjunto de manifestaciones provocan un malestar clínicamente significativo, suponen una pérdida de tiempo notable e interfieren acusadamente en la vida social y familiar del enfermo, así como en su integración académica y laboral (figura 1) (APA, 2013).

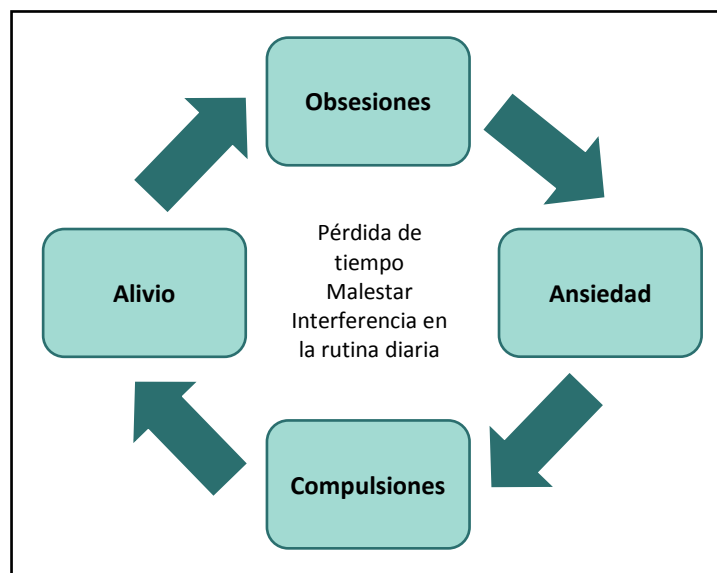


Figura 1. Ciclo de la sintomatología obsesivo-compulsiva.

Debido a la ausencia de marcadores biológicos específicos de la enfermedad, el diagnóstico del TOC se lleva a cabo mediante una evaluación de la sintomatología del paciente a través de una entrevista

clínica y en base a los criterios diagnósticos acordados por expertos psiquiatras y recogidos en los manuales diagnósticos DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*). Históricamente, el TOC ha sido considerado un trastorno neurótico de ansiedad por lo que las versiones anteriores del DSM (DSM-III, DSM-III-R, DSM-IV y DSM-IV-TR) clasificaban esta enfermedad dentro del grupo de trastornos de ansiedad. Sin embargo, diversas evidencias indican que, en comparación con estos trastornos, el TOC presenta importantes diferencias por lo que respecta a la sintomatología, el curso de la enfermedad, la comorbilidad, y los mecanismos neurobiológicos específicos implicados (Stein et al., 2010). En consecuencia, en la última edición del manual diagnóstico (DSM 5ª edición, DSM-5), esta clasificación ha sido modificada de manera que se ha propuesto un nuevo grupo denominado *Trastorno obsesivo-compulsivo y trastornos relacionados*, que incluye trastornos caracterizados por la presencia de pensamientos y comportamientos repetitivos como el TOC, el trastorno dismórfico corporal, el trastorno por acumulación o la tricotilomanía. Los criterios diagnósticos del TOC actualizados en el DSM-5 pueden consultarse en el cuadro 1 (APA, 2013)¹.

A pesar de que el TOC constituye una entidad nosológica unitaria, no hay duda de que se trata de un trastorno muy heterogéneo, con una elevada variabilidad interindividual en la expresión clínica, por lo que dos pacientes pueden presentar perfiles sintomáticos muy distintos (Leckman et al., 1997; Mataix-Cols et al., 2005). El estudio de la diversidad de los síntomas identificados en pacientes con TOC ha permitido clasificar dicha sintomatología en cuatro factores o dimensiones: (1) obsesiones de simetría y compulsiones de orden, repetición y contaje; (2) pensamientos tabú o prohibidos (por ejemplo agresivos, sexuales o religiosos) y compulsiones de comprobación; (3) obsesiones de contaminación y compulsiones de limpieza y (4) obsesiones y compulsiones de acumulación (Bloch et al., 2008; Leckman et al., 1997). En cuanto a la evolución de la sintomatología obsesivo-compulsiva, aproximadamente el 40-50% de los pacientes presenta un curso crónico, pudiendo alargarse durante más de 50 años en más del 35% de los casos (Skoog and Skoog, 1999). Durante este tiempo, las manifestaciones se presentan de forma continua en aproximadamente el 50-70% de los pacientes, mientras que el resto presenta un curso episódico, con periodos de remisión parcial o completa de la sintomatología (Pinto et al., 2006; Soomro, 2012). Además, el tipo o dimensión de los síntomas presentados por un paciente parece mantenerse estable a lo largo del tiempo.

¹En los estudios incluidos en la presente tesis doctoral el diagnóstico y reclutamiento de los pacientes se llevó a cabo siguiendo los criterios establecidos en el DSM-IV, puesto que los criterios DSM-5 salieron a la luz posteriormente al diseño y realización de dichos estudios.

Cuadro 1: Criterios diagnósticos del TOC según la versión actual del DSM-5**A. Presencia de obsesiones, compulsiones o ambas:**

Las obsesiones se definen por (1) y (2):

1. Pensamientos, impulsos o imágenes recurrentes y persistentes que se experimentan, en algún momento durante el trastorno, como intrusas o no deseadas, y que en la mayoría de los sujetos causan ansiedad o malestar importante.
2. El sujeto intenta ignorar o suprimir estos pensamientos, impulsos o imágenes, o neutralizarlos con algún otro pensamiento o acto (es decir, realizando una compulsión).

Las compulsiones se definen por (1) y (2):

1. Comportamientos (p. ej., lavarse las manos, ordenar, comprobar las cosas) o actos mentales (p. ej., rezar, contar, repetir palabras en silencio) repetitivos que el sujeto realiza como respuesta a una obsesión o de acuerdo con reglas que ha de aplicar de manera rígida.
2. El objetivo de los comportamientos o actos mentales es prevenir o disminuir la ansiedad o el malestar, o evitar algún suceso o situación temida; sin embargo, estos comportamientos o actos mentales no están conectados de una manera realista con los destinados a neutralizar o prevenir, o bien resultan claramente excesivos.

Nota: Los niños de corta edad pueden no ser capaces de articular los objetivos de estos comportamientos o actos mentales.

B. Las obsesiones o compulsiones requieren mucho tiempo (p. ej., ocupan más de una hora diaria) o causan malestar clínicamente significativo o deterioro en lo social, laboral u otras áreas importantes del funcionamiento.**C. Los síntomas obsesivo-compulsivos no se pueden atribuir a los efectos fisiológicos de una sustancia (p. ej., una droga, un medicamento) o a otra afección médica.****D. La alteración no se explica mejor por los síntomas de otro trastorno mental (p. ej., preocupaciones excesivas, como en el trastorno de ansiedad generalizada; preocupación por el aspecto, como en el trastorno dismórfico corporal; dificultad de deshacerse o renunciar a las posesiones, como en el trastorno de acumulación; arrancarse el pelo, como en la tricotilomanía [trastorno de arrancarse el pelo]; rascarse la piel, como en el trastorno de exoriación [rascarse la piel]; estereotipias, como en el trastorno de movimientos estereotipados; comportamiento alimentario ritualizado, como en los trastornos de la conducta alimentaria; problemas con sustancias o con el juego, como en los trastornos relacionados con sustancias y trastornos adictivos; preocupación por padecer una enfermedad, como en el trastorno de ansiedad por enfermedad; impulsos o fantasías sexuales, como en los trastornos parafilícos; impulsos, como en los trastornos disruptivos, del control de los impulsos y de la conducta; rumiaciones de culpa, como en el trastorno de depresión mayor; inserción de pensamientos o delirios, como en la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos; o patrones de comportamiento repetitivo, como en los trastornos del espectro autista).**

Especificar si:

Con introspección buena o aceptable: El sujeto reconoce que las creencias del trastorno obsesivo-compulsivo son claramente o probablemente no ciertas, o que pueden ser ciertas o no.

Con poca introspección: El sujeto piensa que las creencias del trastorno obsesivo-compulsivo son probablemente ciertas.

Con ausencia de introspección/con creencias delirantes: El sujeto está completamente convencido de que las creencias del trastorno obsesivo-compulsivo son ciertas.

Especificar si:

El sujeto tiene una historia reciente o antigua de un trastorno de tics.

Fuente: (APA, 2013)

La mayor parte de los pacientes con TOC presenta también otros trastornos psiquiátricos a lo largo del curso de la enfermedad, siendo los trastornos de ansiedad y los trastornos del estado de ánimo las comorbilidades más frecuentes (Hofmeijer-Sevink et al., 2013; Pinto et al., 2006). Se ha descrito que entre el 45 y el 65% de los individuos con TOC sufren o han sufrido un trastorno de ansiedad durante su evolución (Brown et al., 2001; de Mathis et al., 2013) mientras que las tasas de depresión oscilan entre el 65 y el 75% (Hofmeijer-Sevink et al., 2013; Pinto et al., 2006). Además, otros trastornos del neurodesarrollo, como el síndrome de Tourette (ST) y otros trastornos por tics o el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), se presentan frecuentemente de forma cómorbidamente en los pacientes con TOC (Abramovitch et al., 2015; de Mathis et al., 2013; Pinto et al., 2006).

En cuanto al abordaje terapéutico, el tratamiento de elección consiste en la realización de una terapia psicológica denominada terapia cognitivo conductual (TCC). En los casos con una sintomatología de mayor gravedad o cuando la psicoterapia resulta insuficiente para controlar el estado del paciente se procede a realizar una terapia farmacológica basada en el uso de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRSs), principalmente fluoxetina. No obstante, a pesar de la eficacia de esta terapia, entre un 30 y un 50% de los pacientes no responde adecuadamente (Hirschtritt et al., 2017).

Tradicionalmente se ha considerado que el TOC empieza a manifestarse al final de la adolescencia o al inicio de la edad adulta, con una baja frecuencia en niños y adolescentes. Sin embargo, estudios recientes sugieren una distribución bimodal según la edad de aparición de los síntomas, con un pico en la edad adulta, alrededor de los 20 años (inicio tardío) (Ruscio et al., 2010), y otro en la infancia, alrededor de los 12-14 años (inicio temprano), iniciándose en muchos casos antes de los 10 años de edad (Bryńska and Wolańczyk, 2005; Dell'Osso et al., 2016; Stewart et al., 2004; Taylor, 2011). De este modo, la prevalencia en niños y adolescentes parece ser similar a la descrita en estudios realizados en población adulta (1-3%) (Fontenelle et al., 2006). Esta prevalencia aumenta si se tienen en consideración las formas subclínicas de la enfermedad, pudiendo llegar al 5.5%, de acuerdo con los resultados obtenidos en un estudio llevado a cabo en nuestro país con una muestra comunitaria de 1514 niños (Canals et al., 2012). El trastorno de inicio en la infancia puede evolucionar a un trastorno crónico con altas tasas de persistencia en la adultez. Así, aproximadamente el 40% de los casos que comienzan a manifestarse en la niñez continúan en la edad adulta, y el número aumenta al 60% si se tienen en cuenta las presentaciones subclínicas. De hecho, se calcula que en el 30-50% de los individuos adultos con TOC los síntomas obsesivo-compulsivos empiezan a desarrollarse

durante la infancia. Además, el riesgo de cronificación del trastorno parece ser mayor en los pacientes con un inicio temprano de la sintomatología (Skoog and Skoog, 1999; Stewart et al., 2004). Asimismo, el TOC de inicio en la infancia se asocia con un mayor riesgo de padecer otras enfermedades psiquiátricas durante la adultez (Micali et al., 2010; Wewetzer et al., 2001).

Se ha observado que el TOC infantil presenta algunas diferencias clínicas y biológicas respecto al de inicio en la edad adulta, entre las que se incluyen la distribución por sexos, la transmisión familiar y la prevalencia de comorbilidades psiquiátricas. Por un lado, mientras que en individuos adultos los síntomas obsesivo-compulsivos aparecen predominantemente en mujeres, en el TOC infantil se produce un aumento de la frecuencia de afectación en el sexo masculino (Dell’Osso et al., 2016; Geller et al., 1998; Narayanaswamy et al., 2012; Taylor, 2011). Por otro lado, el trastorno de inicio en la niñez parece tener una mayor agregabilidad familiar que el de inicio en la edad adulta, con una tasa de aparición de la enfermedad entre los familiares de primer grado de pacientes con TOC infantil de aproximadamente el doble que en pacientes con un inicio tardío de los síntomas (Pauls et al., 2014; Taylor, 2011). Por lo que respecta al patrón de comorbilidad, se ha observado que los trastornos del neurodesarrollo, como los tics o el TDAH, parecen ser más frecuentes en los niños con TOC, especialmente en los casos de inicio muy temprano, mientras que los trastornos internalizantes, como los trastornos de ansiedad o del estado de ánimo, se presentan de forma comórbida preferentemente en los pacientes con un inicio más tardío de la sintomatología (Ortiz et al., 2016). Así, los trastornos relacionados con tics, principalmente el ST, aparecen en el 20-30% de los individuos con TOC infantil (Ivarsson et al., 2008). A su vez, la presencia de tics parece ser más frecuente en los familiares de primer grado de estos pacientes que en los de inicio tardío. Además, se ha observado que entre el 25 y el 30% de los niños y adolescentes con TOC presentan también otros trastornos del neurodesarrollo como el TDAH (Geller et al., 1996; Masi et al., 2010). Con frecuencia, ambas comorbilidades pueden presentarse conjuntamente en algunos pacientes (Cavanna et al., 2009; Lebowitz et al., 2012; Wanderer et al., 2012). Con respecto a los trastornos internalizantes, a pesar de ser menos frecuentes en el TOC infantil que en el adulto, se ha descrito que pueden presentarse también en estos pacientes, con tasas de alrededor del 30-45% en el caso de los trastornos de ansiedad y del 20-30% para los trastornos depresivos (Ivarsson et al., 2008). Estas diferencias clínicas y epidemiológicas entre el TOC de inicio temprano y el de inicio tardío parecen ser más acusadas si se tienen en consideración los casos con una aparición muy temprana de los síntomas obsesivo-compulsivos (antes de los 10 años de edad). En base a estas observaciones, algunos autores han sugerido que el trastorno infantil podría tratarse de un subtipo diferenciado de

TOC con mecanismos etiopatogénicos distintos (Dell'Osso et al., 2016; Narayanaswamy et al., 2012; Rosario-Campos et al., 2001; Taylor, 2011).

Debido a la elevada heterogeneidad característica del TOC, el estudio de subpoblaciones más homogéneas puede resultar de gran utilidad a la hora de profundizar en las bases fisiopatológicas de la enfermedad y de identificar predictores diagnósticos y de respuesta al tratamiento. Por ello, y dado que el TOC infantil parece constituir un subtipo diferenciado de trastorno, el estudio de estos pacientes separadamente de los individuos con TOC de inicio en la edad adulta permitiría obtener muestras más homogéneas desde el punto de vista etiopatogénico así como por lo que respecta a otros factores de confusión como la edad de los pacientes, el tiempo de evolución o la presencia de comorbilidades y tratamientos farmacológicos, entre otros factores.

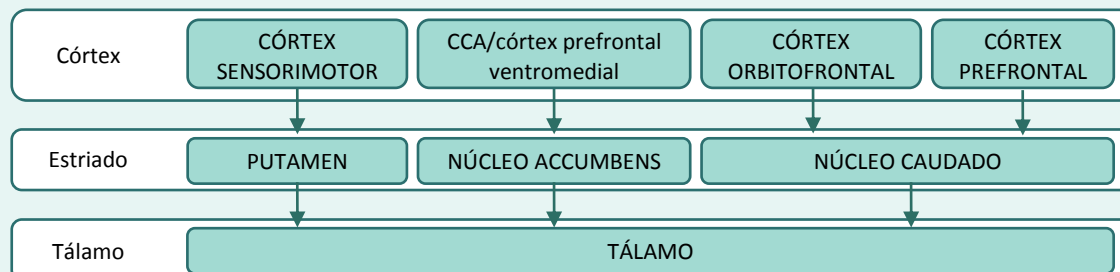
1.2 Etiopatogenia del TOC

A pesar de que se desconoce cuál es exactamente el mecanismo etiopatogénico subyacente del TOC, las evidencias disponibles indican que se trata de un trastorno complejo y multifactorial en el que están implicados múltiples factores genéticos y ambientales que interaccionan entre sí y que determinan la aparición del trastorno (Taylor et al., 2010).

Desde el punto de vista neurobiológico, los datos procedentes de estudios de neuroimagen y neuropsicológicos sugieren la participación de varias áreas cerebrales que se encuentran interconectadas entre sí formando el circuito cortico-estriado-tálamo-cortical (CETC) en la fisiopatología del TOC (cuadro 2) (Abramowitz et al., 2009; Milad and Rauch, 2012; Parmar and Sarkar, 2016; Saxena and Rauch, 2000). Se ha propuesto que la modulación aberrante de este circuito debido, entre otros, a anomalías estructurales y/o a la desregulación de los neurotransmisores implicados [serotonina, dopamina, glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA)] conduciría a una hiperexcitación de estas áreas cerebrales. Esta hiperactividad provocaría una percepción exagerada de sensaciones y pensamientos relacionados con el peligro, la higiene o el daño, que normalmente se suprimirían sin ningún esfuerzo consciente, y aparecerían, por tanto, las obsesiones. Como estos pensamientos no deberían estar presentes de manera habitual, pasarían a percibirse como inapropiados y molestos de modo que el esfuerzo inútil por controlarlos generaría el estado de ansiedad característico de la mayoría de los pacientes con TOC (Pauls et al., 2014). Diversos investigadores han descrito que esta hiperactividad del circuito podría estar relacionada con una hiperactividad asociada al glutamato, principal neurotransmisor excitador implicado en

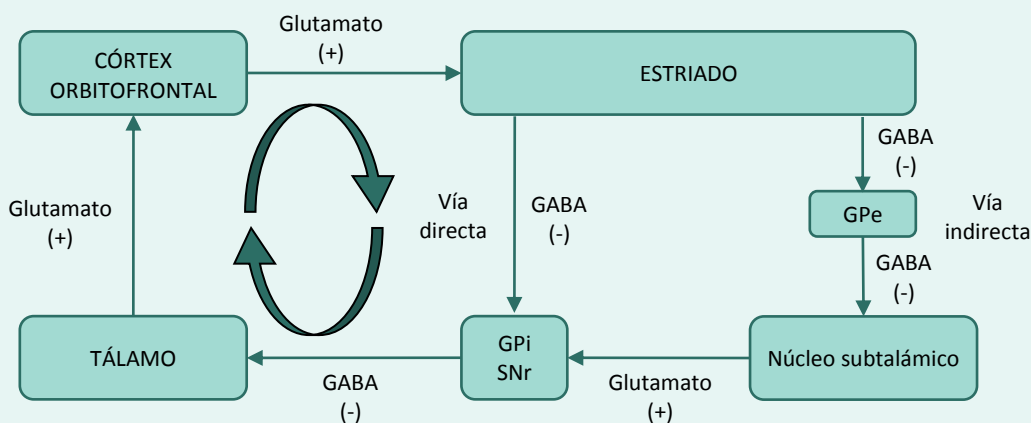
Cuadro 2: Funcionalidad del circuito CETC y su papel en el TOC

La desregulación del circuito CETC o frontoestriatal se ha propuesto como el principal modelo neurobiológico subyacente al TOC. Existen distintos subcircuitos dentro del CETC con proyecciones que se originan en distintas áreas de la corteza cerebral y se dirigen hacia diferentes estructuras del estriado. A continuación puede verse una representación esquemática sobre la conectividad de estos circuitos:



Estas estructuras están implicadas en la regulación de las funciones afectivas y motivacionales, el control de las funciones motoras y los impulsos y la discriminación entre los estímulos que deben ser percibidos de forma consciente y los que no. El circuito más importante por lo que respecta al TOC es el que afecta al córtex orbitofrontal (COF).

Estos circuitos se encuentran perfectamente regulados gracias al equilibrio dinámico entre las vías directa e indirecta a nivel de los ganglios basales. En el cerebro sano, las señales excitatorias glutamatérgicas procedentes del córtex frontal [concretamente del COF y del córtex cingulado anterior (CCA)] provocan una excitación del estriado. Esta activación aumenta las señales inhibitorias del GABA sobre el globo pálido interno y la sustancia nigra a través de la llamada vía directa. En consecuencia, disminuye la liberación de GABA desde estas estructuras hacia el tálamo, provocando una liberación de glutamato sobre el córtex frontal, produciéndose así un fenómeno de retroalimentación positiva. En el circuito externo de la vía indirecta, en cambio, el estriado inhibe el globo pálido externo, que deja de actuar como inhibidor del núcleo subtalámico. Así, el núcleo subtalámico puede activar el globo pálido interno y la sustancia nigra, que inhibirán el tálamo, produciéndose una retroalimentación negativa. En el siguiente esquema puede observarse el circuito correspondiente a las vías directa e indirecta.



En los pacientes con TOC, parece producirse un desequilibrio entre estas vías como consecuencia de una hiperactividad de la vía directa o una hipoactividad de la indirecta, que conduce a una hiperactivación del circuito. Como resultado, estímulos o pensamientos (como la preocupación por el daño, la higiene, el orden, etc.) que deberían ser percibidos de forma inconsciente pasarían a recibir una atención consciente excesiva dando lugar a las obsesiones. El esfuerzo por neutralizar estas obsesiones impulsa a los pacientes a llevar a cabo compulsiones que, debido al alivio temporal de la ansiedad generada por las obsesiones, acaban convirtiéndose en comportamientos repetitivos o rituales.

CETC: circuito córtico-estriado-tálamo-cortical; COF: córtex orbitofrontal; CCA: córtex cingulado anterior; GABA: ácido γ -aminobutírico; GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; SNr: sustancia nigra; TOC: trastorno obsesivo-compulsivo
Fuente: (Milad and Rauch, 2012; Nakao et al., 2014; Pauls et al., 2014; Saxena and Rauch, 2000)

los circuitos frontoestriatales (Carlsson, 2000; Rosenberg et al., 2000). La existencia cada vez mayor de evidencias derivadas de estudios de neuroimagen, modelos animales, genes candidatos y ensayos clínicos que demuestran la efectividad de tratamientos farmacológicos que actúan sobre dianas glutamatérgicas apoya la desregulación de la neurotransmisión del glutamato como principal contribución a la fisiopatología del TOC (Wu et al., 2012). Por otro lado, debido a la eficacia de los fármacos utilizados actualmente en el tratamiento de este trastorno, los ISRSs, y a la utilidad de los antipsicóticos atípicos (antagonistas dopaminérgicos) en pacientes resistentes a la terapia convencional, se ha propuesto que podría existir también una desregulación de la neurotransmisión serotoninérgica y dopaminérgica en esta enfermedad. Así, se ha descrito una alteración de la señalización de estos neurotransmisores en distintas áreas cerebrales en pacientes con TOC (Perani et al., 2008) y se han asociado diversos genes implicados en estos sistemas de neurotransmisión con el riesgo de padecer el trastorno (Taylor, 2016; Walitza et al., 2010). No obstante, se cree que aunque estas alteraciones podrían estar implicadas en la fisiopatología del TOC, podrían ser secundarias a la desregulación del glutamato (Carlsson, 2000). Por otro lado, las alteraciones en la neurotransmisión gabaérgica, responsable de regular la liberación de glutamato en los circuitos frontoestriatales, podrían participar también en la fisiopatología del trastorno. En resumen, el desequilibrio entre estos sistemas de neurotransmisión (glutamato, dopamina, serotonina y GABA) podría afectar a la funcionalidad de las estructuras del circuito CETC provocando la aparición de los síntomas obsesivo-compulsivos.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el TOC es un trastorno complejo en el que intervienen múltiples factores. Así, se ha planteado que las desregulaciones descritas tanto a nivel de las estructuras cortico-estriatales como en los sistemas de neurotransmisión implicados en estos circuitos, estarían desencadenadas por una compleja interacción entre factores de susceptibilidad genética y la exposición a condicionantes ambientales de riesgo entre los que se encuentran las complicaciones perinatales, la exposición a estrés psicosocial, los eventos traumáticos o las infecciones y otros procesos inflamatorios (Brander et al., 2016; Pauls et al., 2014). El mecanismo etiopatogénico a través del cual la interacción gen-ambiente acaba provocando la aparición de la sintomatología psiquiátrica no está del todo claro, pero parece implicar una modificación de los procesos epigenéticos y de la expresión génica. Una de las hipótesis más recientes que se ha propuesto en relación con la etiopatogenia del TOC y otros trastornos psiquiátricos, como la esquizofrenia, el ST o el trastorno del espectro autista (TEA), es la hipótesis neuroinmunitaria (Bergink et al., 2014; Frick and Pittenger, 2016; Gottfried et al., 2015; Martino et al., 2015). En base a esta idea, en respuesta a determinados factores ambientales en individuos genéticamente

susceptibles, se produciría una activación del sistema inmunitario y neuroendocrino, capaces de inducir cambios funcionales a nivel periférico y del sistema nervioso central (SNC), originando así alteraciones en los sistemas de neurotransmisión que acabarían provocando el desequilibrio descrito a nivel del circuito CETC. Esta desregulación conduciría, en último término, a la aparición de los síntomas neuropsiquiátricos (figura 2).

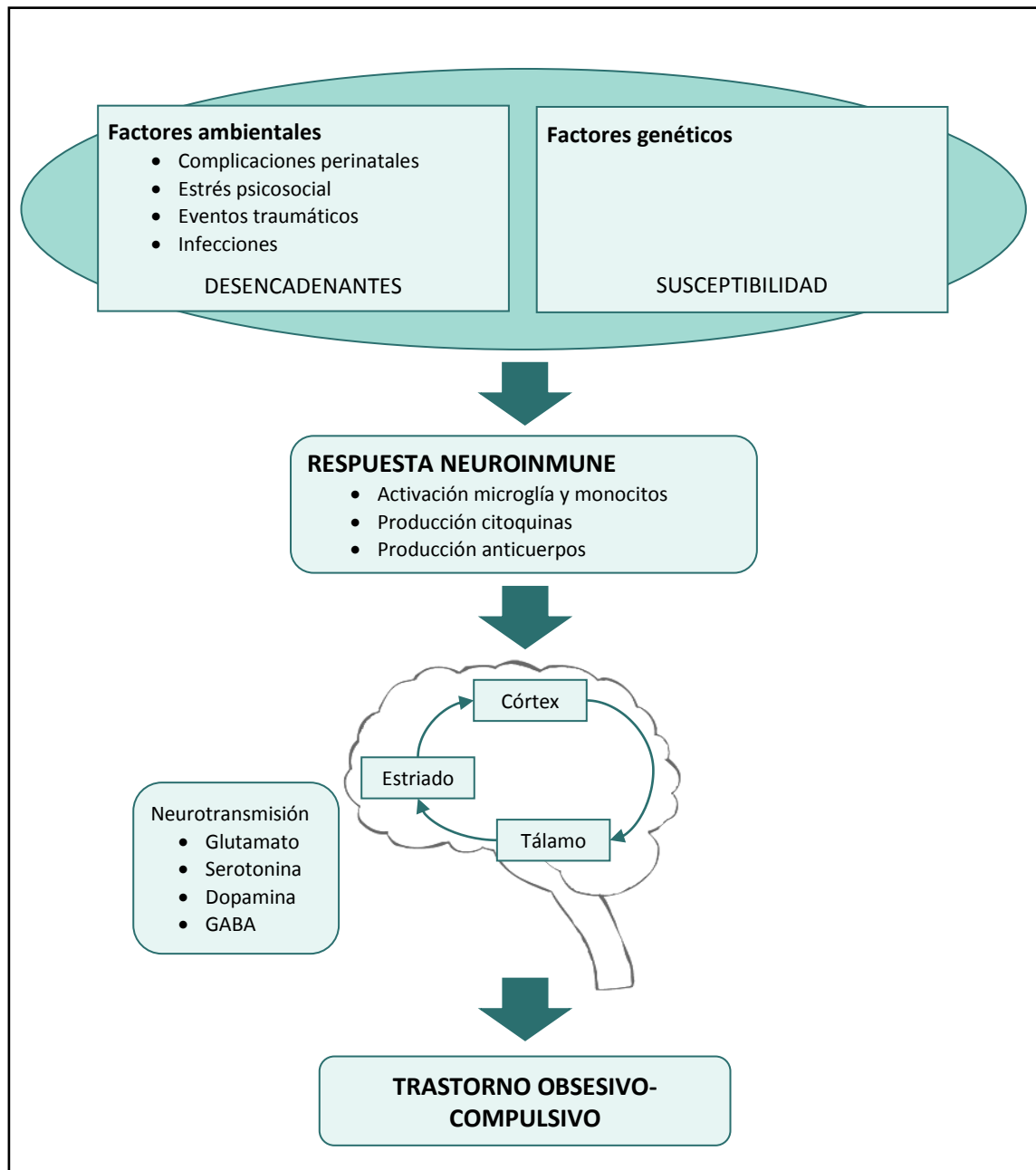


Figura 2. Modelo integrativo de la fisiopatología del TOC. Hipótesis neuroinmunitaria.

1.2.1 Papel de la genética en el TOC de inicio en la infancia y la adolescencia

Los estudios llevados a cabo en familias y con gemelos así como los estudios genéticos de asociación han demostrado que el TOC tiene un importante componente familiar y que los factores genéticos juegan un papel clave en la manifestación de esta enfermedad. Se estima que la heredabilidad del trastorno se sitúa alrededor del 40%, pudiendo llegar hasta el 65% en los casos de inicio durante la infancia (Davis et al., 2013; Pauls, 2010; Taylor, 2011). Se ha descrito que el riesgo de padecer TOC es mayor en familiares de pacientes obsesivos que en familiares de individuos sanos y este riesgo aumenta proporcionalmente con el grado de parentesco (figura 3). Así, mientras que el riesgo de aparición de la enfermedad en la población general es del 1-3%, se calcula que para los familiares de primer grado (padres, hermanos o hijos) de un paciente con TOC este riesgo puede ascender hasta el 10-20% (Browne et al., 2014; Fontenelle and Hasler, 2008; Mataix-Cols et al., 2013). Además, tal y como se ha comentado anteriormente, la agregabilidad familiar es mayor en el TOC de inicio en la infancia, para el que se ha descrito una frecuencia de aparición de la enfermedad entre los familiares de primer grado de aproximadamente el doble que en el caso del TOC de inicio en la edad adulta (Pauls et al., 2014; Taylor, 2011).

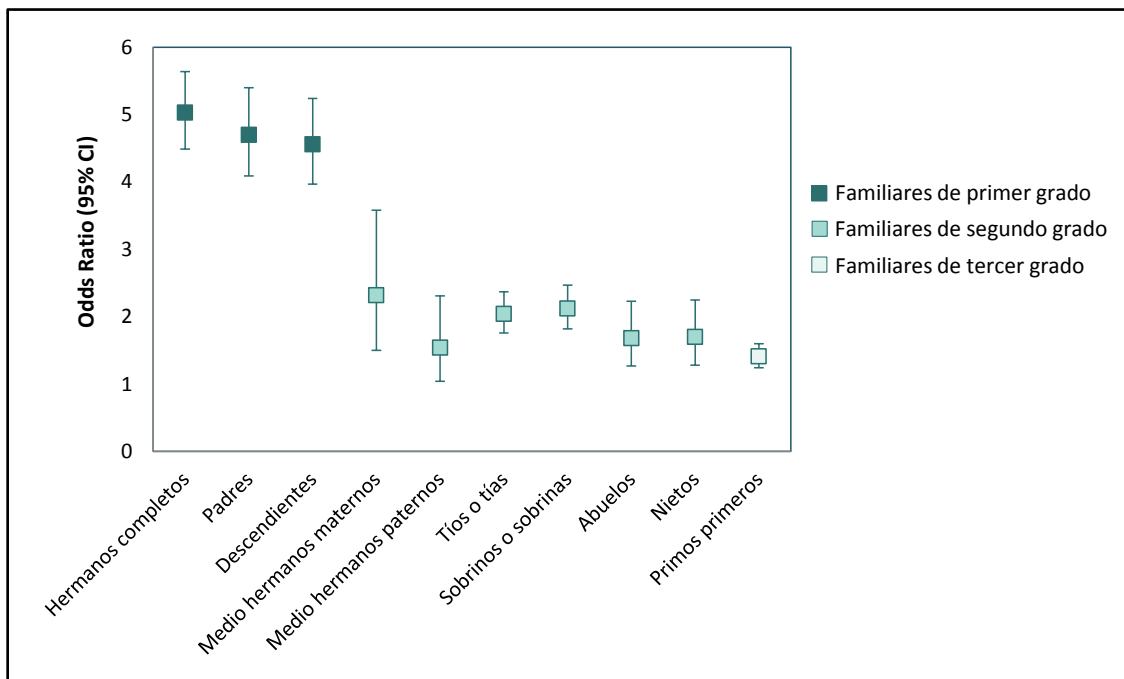


Figura 3. Riesgo genético de padecer TOC entre los familiares de pacientes con TOC en función del grado de parentesco en comparación con sujetos control (adaptado de Mataix-Cols et al., 2013).

Del mismo modo que sucede con otros trastornos psiquiátricos complejos, el TOC se trata de un trastorno poligénico, en el que la susceptibilidad genética no está determinada por el efecto de un único gen sino por la adición de diversas variantes en varios genes con efectos pequeños o moderados que actúan interaccionando a nivel cerebral (Mattheisen et al., 2015; Stewart et al., 2013; Taylor, 2013). Las variantes genéticas más comunes, que constituyen aproximadamente un 90% del total de variaciones del genoma humano, consisten en la sustitución de una sola base en la secuencia de ácido desoxiribonucleico (ADN) y afectan al menos a un 1% de la población general. Este tipo de variantes recibe el nombre de polimorfismos de una sola base o SNPs (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*). Según su localización en la secuencia de ADN y el tipo de cambio genético que se produzca, estos polimorfismos pueden tener diferentes repercusiones funcionales. Así, algunas variantes localizadas en la región codificante pueden alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, modificando su afinidad y funcionalidad, mientras que los polimorfismos que se encuentran en regiones reguladoras, como la zona promotora del gen o regiones *enhancer*, pueden modificar la capacidad de unión de los factores de transcripción o el procesamiento del ácido ribonucleico (ARN) mensajero, alterando así los niveles de expresión del gen (Chorley et al., 2008).

En relación con el TOC, se han publicado más de 100 estudios de genes candidatos, diseñados en base al conocimiento existente sobre los circuitos cerebrales y los neurotransmisores involucrados en la fisiopatología de la enfermedad. Así, la mayoría de estos estudios se han focalizado en el análisis de variantes génicas implicadas en las vías serotoninérgica, dopaminérgica y glutamatérgica, o bien en genes relacionados con la sustancia blanca o el neurodesarrollo (Walitza et al., 2010; Wu et al., 2012). Como resultado, se han identificado diversos polimorfismos genéticos en genes candidatos del sistema serotoninérgico (*HTR2A*, *HTR1A*, *SLC6A4*) y otros sistemas de neurotransmisión (*COMT*, *SLC1A1*) asociados con el riesgo de aparición del TOC (Browne et al., 2014; Taylor, 2016; Walitza et al., 2010). Recientemente, en un estudio de familias llevado a cabo por nuestro grupo identificamos que las variantes genéticas en el receptor de la serotonina 1B (*HTR1B*) y en la glutamato descarboxilasa (*GAD2*) se encontraban asociadas con este trastorno (Mas et al., 2014). Además, hemos observado que determinados polimorfismos en genes relacionados con la serotonina (*SLC18A1*, *HTR1B*), la dopamina (*SLC6A3*, *DRD3*), el glutamato (*GRIA1*, *SLC1A1*) o las neurotrofinas (*NGFR*) se asocian con alteraciones en la sustancia blanca y con las concentraciones de neurometabolitos en el córtex anterior cingulado de pacientes con TOC (Gassó et al., 2015; Ortiz et al., 2015). No obstante, los estudios de genes candidatos presentan el inconveniente de que están limitados por el conocimiento existente sobre las bases etiopatogénicas de la enfermedad por lo

que, a pesar de que esta estrategia ha permitido identificar algunas asociaciones con el TOC, muchos otros genes aún inexplorados podrían estar participando en el desarrollo del trastorno. En este sentido, los estudios de asociación a nivel de todo el genoma (GWAS, del inglés *genome-wide association study*) permiten realizar una exploración de la variabilidad existente a lo largo de todo el genoma mediante la inclusión de más de un millón de marcadores, sin centrarse únicamente en el análisis de unos genes concretos. Los polimorfismos genéticos evaluados en estos estudios no tienen por qué ser funcionales o los causales de la enfermedad sino que se utilizan SNPs marcadores o tagSNPs con el fin de identificar una región genómica que contiene la variante causal, que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el tagSNP. Se han llevado a cabo dos estudios GWAS en pacientes con TOC (Mattheisen et al., 2015; Stewart et al., 2013), en los cuales no se ha identificado ninguna variante génica significativamente asociada con el trastorno. Curiosamente, en un metaanálisis reciente incluyendo los datos procedentes de ambos estudios se observó que, a pesar de que ninguna variante genética se asociaba significativamente con el riesgo de padecer TOC, el *polygenic risk score* identificado en cada uno de los estudios a nivel individual permitía predecir el estatus caso-control en la otra población (Arnold et al., 2017).

A pesar de los hallazgos obtenidos, existe cierta discrepancia entre los resultados de los diferentes estudios llevados a cabo. Esta controversia puede ser atribuible tanto al efecto parcial de cada uno de los posibles genes de susceptibilidad como a la heterogeneidad de los pacientes incluidos en los estudios genéticos. Además, muchos estudios utilizan una muestra reducida con bajo poder estadístico para detectar los efectos genéticos pequeños. Por ello, la realización de estudios de asociación genética en poblaciones más homogéneas, como pacientes con TOC de inicio en la infancia, para los que se ha descrito una mayor influencia genética, podría facilitar la identificación de marcadores genéticos más precisos y específicos.

1.2.2 Papel del sistema inmunitario en el TOC de inicio en la infancia y la adolescencia

Tal y como ya se ha expuesto anteriormente, la teoría sobre una posible desregulación del sistema inmunitario subyacente al desarrollo de los trastornos psiquiátricos ha ido tomando especial relevancia en las últimas décadas. Así, se ha planteado que la exposición a determinados factores ambientales como las situaciones traumáticas, el estrés psicosocial o las enfermedades infecciosas podrían provocar una activación del sistema inmunitario y neuroendocrino, que conllevaría una serie de cambios en la funcionalidad y la plasticidad sináptica, con la consiguiente aparición de alteraciones en el comportamiento.

La hipótesis inmunológica del TOC tiene su origen en la asociación descrita entre este trastorno y la respuesta inmunitaria a las infecciones por estreptococo. A finales de la década de los 80, Swedo y colaboradores observaron un aumento de la frecuencia de síntomas obsesivo-compulsivos en niños y adolescentes diagnosticados de corea de Sydenham, una complicación neurológica tardía secundaria a la infección por estreptococo β -hemolítico del grupo A (GABHS) y presente en pacientes con fiebre reumática aguda, una enfermedad inflamatoria autoinmune (Swedo et al., 1989). Se ha observado, además, que los individuos que han padecido infecciones por estreptococo, en ausencia de corea de Sydenham o fiebre reumática, presentan también un riesgo más elevado de desarrollar TOC (Teixeira et al., 2014). Esta condición recibe el nombre de PANDAS (del inglés, *Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections*) y hace referencia a la aparición de tics y/o síntomas obsesivo-compulsivos de forma repentina tras una infección reciente por estreptococo (Swedo, 2002; Swedo et al., 1998). A pesar de que existe cierta controversia, se ha propuesto que estos trastornos neuropsiquiátricos desencadenados por la infección por GABHS podrían ser el resultado de mecanismos autoinmunes basados en la producción de anticuerpos anti-estreptococo capaces de reaccionar de forma cruzada en contra de estructuras de los ganglios basales, provocando así una disfunción en esta región cerebral (Allen et al., 1995; da Rocha et al., 2008; Teixeira et al., 2014). Además de las infecciones por estreptococo, las causadas por otros patógenos con tropismo por el sistema nervioso central como *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii* o el virus Borna se han asociado también con el TOC y otros trastornos relacionados (Krause et al., 2010; Swedo et al., 2012; Teixeira et al., 2014). Así, se han identificado niveles más elevados de anticuerpos anti-*Toxoplasma*, un parásito con un gran tropismo por el cerebro y especialmente por los ganglios basales, en pacientes con TOC que en individuos control (Miman et al., 2010). El mecanismo por el cual esta infección es capaz de afectar la función neuronal es incierto, pero podría implicar, por un lado, el daño directo producido por el parásito sobre las neuronas y las células de la glía y, por el otro, la inducción de la respuesta inmunitaria con la consiguiente liberación de diversas citoquinas, procesos que acabarían provocando una desregulación de la neurotransmisión (Teixeira et al., 2014). Por lo que respecta al virus Borna, se ha sugerido que su asociación con el TOC podría estar relacionada con un aumento de los niveles de glutamato como resultado de la respuesta inmunitaria inducida por el virus, que llevaría a una alteración de la funcionalidad a nivel tálamo-cortical (Rotge et al., 2010). Además de los distintos factores infecciosos descritos, otros factores etiológicos no infecciosos podrían contribuir a la aparición abrupta de esta sintomatología psiquiátrica, por lo que se ha reformulado el concepto de PANDAS y se ha descrito un nuevo término denominado PANS (del

inglés, *Pediatric Acute-Onset Neuropsychiatric Syndrome*) que hace referencia a un síndrome psiquiátrico agudo de espectro más amplio y no asociado únicamente con el estreptococo (Swedo et al., 2012).

En base a estos hallazgos, se ha planteado que las alteraciones inmunológicas inducidas por la presencia de agentes patógenos u otros estresores biológicos podrían tener un papel destacado en la etiopatogenia del TOC, especialmente en el caso de niños y adolescentes, por lo que algunos estudios han explorado la presencia de alteraciones en parámetros inmunológicos y en genes relacionados con el sistema inmunitario en individuos afectados por este trastorno.

Entre los parámetros relacionados con la respuesta inmunitaria más evaluados en estos pacientes se encuentran los niveles de citoquinas, proteínas que actúan como mediadores de los procesos inflamatorios. No obstante, los estudios llevados a cabo hasta la fecha en individuos con TOC son muy escasos y no han proporcionado resultados concluyentes (tabla 1). Las discrepancias en los hallazgos identificados podrían ser debidas a la heterogeneidad en la metodología de determinación de las citoquinas y en las muestras de pacientes utilizadas por lo que respecta a la edad, edad de inicio, tiempo de evolución o presencia de tratamientos farmacológicos y comorbilidades. Por ello, resulta necesario realizar más estudios en subgrupos de pacientes más homogéneos que permitan comprender mejor el papel de las citoquinas en la fisiopatología del TOC.

Por otro lado, se han investigado posibles alteraciones en otros parámetros relacionados con el sistema inmunitario. Así, se ha descrito una mayor presencia de anticuerpos dirigidos contra estructuras de los ganglios basales tanto en el suero (Dale et al., 2005; Morer et al., 2008; Nicholson et al., 2012; Pearlman et al., 2014) como en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Bhattacharyya et al., 2009) de pacientes diagnosticados con TOC respecto a individuos control. Además, aunque menos estudiadas, algunos investigadores han observado alteraciones en el patrón de células inmunitarias en estos pacientes, tales como una disminución en la actividad de células NK (*natural killer*) (Denys et al., 2004), un aumento de los niveles de linfocitos T CD8+ y una reducción en los niveles de linfocitos T CD4+, siendo estas dos últimas alteraciones corregidas por el tratamiento con ISRS (Marazziti et al., 2009, 1999).

Tabla 1. Estudios de asociación de citoquinas en el TOC

Citoquina	Niveles comparados con el grupo control	Muestra	Individuos de estudio	Presencia de psicofármacos	Referencia
IL-1 β	=	Plasma	Adultos con TOC	No	(Maes et al., 1994)
	=	Plasma	Adultos con TOC	No	(Monteleone et al., 1998)
	=	Plasma	Niños con TOC + Tourette ^a	Sí	(Gabbay et al., 2009)
	↓	Plasma	Adultos con TOC	No	(Brambilla et al., 1997)
	↓	Plasma	TOC (metaanálisis)	Sí	(Gray and Bloch, 2012)
	=	Producción ex vivo (PBMC estimuladas con LPS)	Adultos con TOC	No	(Weizman et al., 1996)
IL-6	=	Plasma	Adultos con TOC	No	(Maes et al., 1994)
	=	Plasma	Adultos con TOC	No	(Monteleone et al., 1998)
	=	Plasma	Niños con TOC + Tourette ^a	Sí	(Gabbay et al., 2009)
	↑	Plasma	Adultos con TOC	No	(Rao et al., 2015)
	↑	Plasma	Adultos con TOC	No	(Konuk et al., 2007)
	=	Suero	Niños con TOC	No	(Şimşek et al., 2016)
	=	Suero	Niños con TOC y/o Tourette	Sí	(Leckman et al., 2005)
	=	LCR	Adultos con TOC	No	(Carpenter et al., 2002)
	=	Producción ex vivo (sangre total estimulada con LPS)	Adultos con TOC	No	(Denys et al., 2004)
	↓	Producción ex vivo (sangre total estimulada por LPS)	Adultos con TOC	No	(Fluitman et al., 2010b)
	↓	Producción ex vivo (sangre total estimulada por LPS)	Adultos con TOC	Sí	(Fluitman et al., 2010a)
TNF- α	=	Plasma	Niños con TOC + Tourette ^a	Sí	(Gabbay et al., 2009)
	=	Plasma	Adultos con TOC	Sí	(Fontenelle et al., 2012)
	↓	Plasma	Adultos con TOC	No	(Brambilla et al., 1997)
	↓	Plasma	Adultos con TOC	No	(Monteleone et al., 1998)
	↑	Plasma	Adultos con TOC	No	(Konuk et al., 2007)
	↑	Suero	Niños con TOC	Sí	(Leckman et al., 2005)
	↑	Suero	Niños con TOC	No	(Şimşek et al., 2016)
	=	Producción ex vivo (sangre total estimulada con LPS)	Adultos con TOC	No	(Fluitman et al., 2010b)
	↓	Producción ex vivo (sangre total estimulada por LPS)	Adultos con TOC	No	(Denys et al., 2004)
	↓	Producción ex vivo (sangre total estimulada con LPS)	Adultos con TOC	Sí	(Fluitman et al., 2010a)

Tabla 1. Continuación					
Citoquina	Niveles comparados con el grupo control	Muestra	Individuos de estudio	Presencia de psicofármacos	Referencia
IL-2	↑ (vs Tourette sin TOC)	Producción ex vivo (sangre total estimulada con LPS)	Niños con TOC + Tourette ^a	Sí	(Gabbay et al., 2009)
	↑	Suero	Niños con TOC	No	(Şimşek et al., 2016)
	=	Suero	Niños con TOC	Sí	(Leckman et al., 2005)
	=	Producción ex vivo (PBMC estimuladas con LPS)	Niños con TOC	No	(Weizman et al., 1996)
IFN-γ	=	Plasma	Adultos con TOC	No	(Rao et al., 2015)
	=	Suero	Niños con TOC y/o Tourette	Sí	(Leckman et al., 2005)
	=	Suero	Niños con TOC y/o Tourette	No	(Şimşek et al., 2016)
	=	Producción ex vivo (sangre total estimulada con LPS)	Adultos con TOC	No	(Denys et al., 2004)
IL-12	↑	Plasma	Niños con TOC + Tourette ^a	Sí	(Gabbay et al., 2009)
	↑	Plasma	Niños con TOC y/o Tourette	Sí	(Leckman et al., 2005)
IL-8	=	Producción ex vivo (sangre total estimulada con LPS)	Adultos con TOC	No	(Fluitman et al., 2010b)
IL-17A	↑	Suero	Niños con TOC	No	(Şimşek et al., 2016)
IL-4	↑	Plasma	Adultos con TOC	No	(Rao et al., 2015)
	=	Suero	Niños con TOC y/o Tourette	Sí	(Leckman et al., 2005)
	=	Suero	Niños con TOC	No	(Şimşek et al., 2016)
	=	Producción ex vivo (sangre total estimulada con LPS)	Adultos con TOC	No	(Denys et al., 2004)
IL-10	↑	Plasma	Adultos con TOC	No	(Rao et al., 2015)
	=	Suero	Niños con TOC y/o Tourette	Sí	(Leckman et al., 2005)
	=	Suero	Niños con TOC	No	(Şimşek et al., 2016)
	=	Producción ex vivo (sangre total estimulada con LPS)	Adultos con TOC	No	(Denys et al., 2004)

IL: interleuquina; IFN-γ: interferón gamma; LCR: líquido cefalorraquídeo; LPS: lipopolisacárido; PBMC: células mononucleares de sangre periférica; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa; TOC: trastorno obsesivo – compulsivo

^aTOC comórbido con trastorno de Tourette

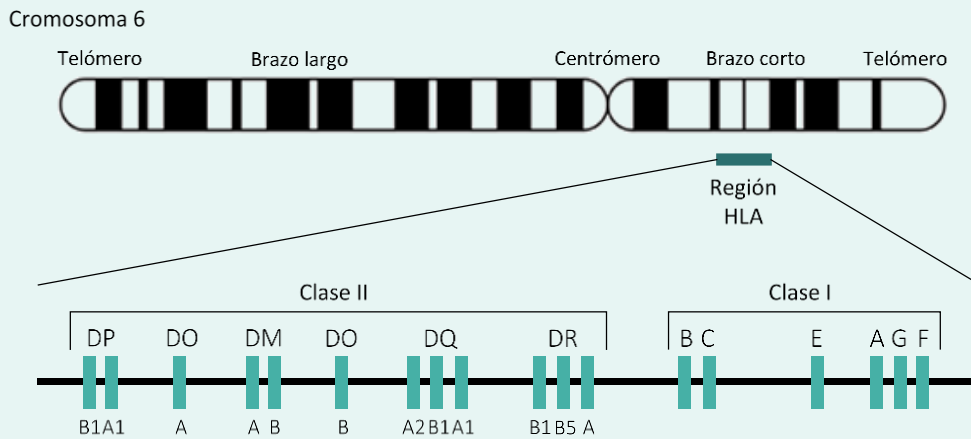
↑ niveles superiores a la población control; ↓ niveles inferiores a la población control; = niveles iguales a la población control

Desde el punto de vista genético, son varias las asociaciones identificadas entre polimorfismos en genes implicados en el sistema inmunitario y el TOC. Dos variantes (rs1800629 y rs361525) del gen *TNFA*, que codifica para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), una citoquina proinflamatoria, previamente relacionadas con la aparición de enfermedades inflamatorias autoinmunes como la fiebre reumática o la psoriasis (Kaluzka et al., 2000; Sallakci et al., 2005), han sido asociadas con el riesgo de padecer TOC (Cappi et al., 2012; Hounie et al., 2008). Ambos polimorfismos se encuentran localizados en la región promotora del gen por lo que se ha propuesto que podrían modificar los niveles de expresión génica (Kaluzka et al., 2000; Sallakci et al., 2005). Por otro lado, un estudio reciente de secuenciación del exoma llevado a cabo por Cappi y colaboradores ha identificado que en pacientes con TOC existe una mayor frecuencia de aparición de variantes raras en genes implicados en procesos inmunológicos, como la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), entre otros (Cappi et al., 2016). Además, cabe destacar la asociación descrita en diferentes estudios entre variantes relacionadas con la región génica del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) y el riesgo de padecer TOC (Costas et al., 2016; den Braber et al., 2016). Esta región incluye un gran número de genes altamente polimórficos entre los que se encuentran los genes que codifican para los antígenos leucocitarios humanos clásicos (HLA, del inglés *Human Leukocyte Antigen*), implicados en la presentación de antígenos (cuadro 3). Los genes HLA clásicos se clasifican en genes de clase I (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) y genes de clase II (*HLA-DRA1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQA2*, *HLA-DQB1*, *HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*) (Walsh et al., 2003). La combinación de distintas variantes alélicas en los genes HLA podría definir la susceptibilidad individual a padecer ciertas enfermedades. Concretamente, los alelos de los genes de clase II, y principalmente del *HLA-DRB1* y el *HLA-DQB1*, se han asociado con un gran número de enfermedades entre las cuales se encuentran las enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la diabetes mellitus, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple o el lupus eritematoso (Miyadera and Tokunaga, 2015). Asimismo, esta región ha sido ampliamente asociada con otros trastornos neuropsiquiátricos, principalmente con la esquizofrenia (Kadasah et al., 2011; Li et al., 2001; Sayeh et al., 2014) y el TEA (Chien et al., 2012; Lee et al., 2006; Torres et al., 2016, 2002; Warren et al., 1996).

Cuadro 3: El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC): Estructura y función

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es una región genómica de aproximadamente 4 Mb localizada en el brazo corto del cromosoma 6. Esta región contiene más de 250 genes y pseudogenes que codifican para ligandos, receptores, citoquinas, factores de señalización, reguladores de la transcripción, etc., implicados en la respuesta inflamatoria y la interacción con otros elementos de la inmunidad innata y la inmunidad adquirida así como en el reconocimiento de antígenos propios versus no propios. Además, estos genes participan también en la funcionalidad y el desarrollo del sistema nervioso central, la plasticidad sináptica, la neurogénesis, la diferenciación neuronal o las interacciones neuronales, entre otros.

Entre los genes localizados en la región MHC se encuentran los que codifican para los antígenos leucocitarios humanos de superficie (HLA, del inglés *Human Leukocyte Antigen*), implicados en la presentación de antígenos a las células T y responsables, por tanto, de activar la respuesta inmunitaria adaptativa. Los genes HLA se distribuyen en dos regiones distintas, la región MHC de clase I y la región de clase II. En la región de clase I se localizan 6 genes que codifican para los antígenos HLA clásicos *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C* y los no clásicos *HLA-E*, *HLA-F* y *HLA-G*, además de otros loci no codificantes y pseudogenes. En la región de clase II encontramos 8 genes clásicos codificados en 3 loci, *HLA-DR*, *HLA-DQ* y *HLA-DP*, y 4 genes no clásicos en los loci *HLA-DO* y *HLA-DM*. En la siguiente figura se puede ver un esquema representativo de la localización de estos genes.



Estas regiones son altamente polimórficas y son consideradas las más variables de todo el genoma, con aproximadamente 70 000 SNPs a lo largo de toda la región. Los picos de diversidad se concentran en los exones de los genes clásicos (*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DR*, *-DQ* y *-DP*) que codifican para la zona de unión a los antígenos. El conjunto de polimorfismos que presenta un individuo en cada uno de estos genes define lo que denominamos alelo para el gen HLA correspondiente. Las proteínas codificadas por distintos alelos pueden ser reconocidas por anticuerpos distintos. Algunos alelos presentan una secuencia muy similar por lo que las proteínas codificadas pueden ser reconocidas por un mismo anticuerpo. En estos casos, el conjunto de estos alelos recibe el nombre de serotipo.

Se ha descrito que la combinación de determinadas variantes alélicas en estos genes podría definir la susceptibilidad individual a padecer ciertas enfermedades, tanto de tipo infeccioso y autoinmune (diabetes tipo I, enfermedad celíaca, psoriasis, artritis reumatoide o lupus eritematoso, entre otras) como enfermedades psiquiátricas (TEA, esquizofrenia). Concretamente, los alelos de los genes HLA de clase II parecen tener un papel más relevante en la aparición de enfermedades de base autoinmune.

HLA: antígeno leucocitario humano; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; TEA: trastorno del espectro autista
Fuente: (Shiina et al., 2009; Walsh et al., 2003)

A pesar de las discrepancias existentes entre los resultados obtenidos en los distintos estudios, las evidencias descritas refuerzan la posible implicación de mecanismos neuroinmunitarios, desencadenados por distintos estímulos a nivel periférico o central, en la fisiopatología del TOC. Las principales células implicadas en el inicio de la respuesta inmunitaria tras la exposición a estímulos como la presencia de agentes patógenos son las células de la inmunidad innata, cuyo papel resulta crucial no solo en el inicio de la respuesta inflamatoria sino también en su propagación. Estas células promueven respuestas rápidas y dirigen la respuesta inflamatoria gracias a su capacidad de fagocitar material externo, a la liberación de citoquinas proinflamatorias, a la presentación de antígenos y a la activación de una cascada de efectos subsiguientes que incluyen la secreción de anticuerpos específicos (Auffray et al., 2009). A nivel periférico, las principales células implicadas en la inmunidad innata son los monocitos circulantes mientras que a nivel del SNC son las células de la microglía.

Los monocitos circulantes constituyen una población heterogénea de manera que pueden ser clasificados en tres subpoblaciones funcionalmente distintas en base a los niveles de expresión de distintos marcadores de superficie como el CD14 (del inglés, *cluster of differentiation*) o el CD16. Así, pueden distinguirse los monocitos clásicos (CD14^{alto}CD16⁻), que constituyen la población mayoritaria (85-90%), los monocitos intermedios (CD14^{alto}CD16^{bajo}), que representan el 5-8% de los monocitos totales, y los monocitos no clásicos (CD14^{bajo}CD16^{alto}), con una proporción del 5-10% (Wong et al., 2012) (tabla 2). Se ha propuesto que podría existir una relación secuencial entre estos subtipos celulares de manera que a lo largo de una enfermedad infecciosa o inflamatoria se produciría primero un aumento de los monocitos intermedios seguido de un incremento en la población no clásica (Ziegler-Heitbrock, 2007; Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013). Debido a este desarrollo transitorio asociado a la presencia de procesos inflamatorios, el grupo de monocitos CD16+, que incluye tanto los monocitos intermedios como los no clásicos, recibe también el nombre de monocitos proinflamatorios. Además, el hecho de que esta subpoblación presente mayores niveles de HLA-DR y, por lo tanto, mayor capacidad de presentación de antígenos así como una mayor producción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL-6), la IL-1 β o el TNF- α , refuerzan esta denominación (Cros et al., 2010; Wong et al., 2012, 2011; Zawada et al., 2011). Dentro del grupo de monocitos CD16+, se ha observado que los intermedios presentarían mayores propiedades proinflamatorias.

Tabla 2. Características fenotípicas y funcionales de las distintas subpoblaciones de monocitos		
Subpoblación	Marcadores de superficie	Funcionalidad
Monocitos clásicos	CD14 ^{alto} CD16 ⁻	Mayor capacidad fagocítica
Monocitos intermedios	CD14 ^{alto} CD16 ^{bajo}	Presentación de antígenos Activación de células T Producción de citoquinas proinflamatorias
Monocitos no clásicos	CD14 ^{bajo} CD16 ^{alto}	Exploración de signos de inflamación Activación de células T Producción de citoquinas proinflamatorias

Fuente: (Wong et al., 2012; Ziegler-Heitbrock, 2007)

Por lo que respecta a las células de la microglía, es la población de células inmunitarias residentes del SNC y está constituida, al igual que los monocitos, por células derivadas de la línea mieloide. Estas células se originan principalmente a partir de precursores eritromieloides del saco vitelino durante el desarrollo embrionario, con una contribución mínima por parte de las células hematopoyéticas en el individuo adulto (Waisman et al., 2015). En caso de daño neuronal o infección cerebral las células de la microglía serán las responsables de iniciar la respuesta inflamatoria. No obstante, cuando el daño es demasiado prolongado o intenso tanto los monocitos circulantes como las citoquinas periféricas son capaces de penetrar en el SNC, donde promueven la neuroinflamación y alteran la funcionalidad cerebral (Felger and Lotrich, 2013; London et al., 2013; Prinz and Priller, 2014; Williams et al., 2012). En estas condiciones, la activación de monocitos y microglía y la secreción de citoquinas proinflamatorias desencadenan procesos de neurotoxicidad. Por otro lado, además de su función clave en la respuesta inmunitaria a infecciones o daños cerebrales, en ausencia de estímulos inflamatorios la microglía participa en la homeostasis del SNC, en la plasticidad neuronal y en el desarrollo y funcionalidad cerebral, tanto durante la embriogénesis como en el periodo postnatal y en el individuo adulto (London et al., 2013). Se ha observado que en condiciones fisiológicas las células de la microglía son capaces de explorar constantemente el entorno neuronal gracias a sus ramificaciones, que les permiten detectar, transducir, integrar y responder a las señales extracelulares con el fin de mantener la homeostasis cerebral. Así, fagocitan restos de células neuronales apoptóticas, eliminan sinapsis no funcionales y secretan factores de crecimiento y neurotrofinas (Beumer et al., 2012).

Debido a las funciones descritas para las células de la inmunidad innata, incluyendo los monocitos y la microglía, se ha sugerido que la desregulación de estas células, ya sea por una hiperactivación neurotóxica o una hipofuncionalidad neuroprotectora, podría ser clave en los mecanismos neuroinmunitarios implicados en el desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas (Beumer et al.,

2012; Frick and Pittenger, 2016; Frick et al., 2013; Nakagawa and Chiba, 2014; Takano, 2015). Así, los resultados obtenidos en estudios de neuroimagen y de expresión génica demuestran la posible implicación de monocitos y microglía en trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia, los trastornos de ansiedad, la depresión, el TEA o el ST (Bergink et al., 2014; Edmonson et al., 2016; Martino et al., 2015; Prata et al., 2017; Yirmiya et al., 2015). Sin embargo, a pesar de que las evidencias existentes parecen sugerir la participación de mecanismos inmunitarios en la fisiopatología del TOC, no se han llevado a cabo estudios que exploren las posibles alteraciones concretas en los monocitos y la microglía de pacientes con este trastorno.

1.3 Tratamiento del TOC de inicio en la infancia y la adolescencia

Debido a que el TOC se asocia con una disminución de la funcionalidad y la calidad de vida del paciente así como con un coste personal, social y económico elevado, el manejo precoz resulta crucial para un mejor control de la enfermedad y de sus consecuencias. En el caso de la población pediátrica, la disfunción social, familiar y académica puede conllevar un empeoramiento significativo de la calidad de vida a largo plazo (Sookman and Fineberg, 2015). Además, el riesgo de cronificación del trastorno y de persistencia en la edad adulta parece aumentar en ausencia de un tratamiento adecuado (Micali et al., 2010). Por ello, la intervención precoz resulta aún más importante en los pacientes con un inicio de la sintomatología durante la infancia o la adolescencia.

En la actualidad, el tratamiento del TOC incluye el uso de la terapia farmacológica junto con la intervención psicológica. La elección del plan terapéutico más adecuado se basa en la valoración de la gravedad de los síntomas obsesivo-compulsivos, que puede llevarse a cabo mediante el uso de instrumentos clínicos y escalas de cuantificación estandarizadas como la *Children's Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale* (CY-BOCS) (Scahill et al., 1997), utilizada en la población infantil. Además, a la hora de decidir el tratamiento de cada paciente es importante tener en cuenta otros factores como la presencia de comorbilidades, la exposición a factores psicosociales estresantes, el grado de implicación del paciente y la familia en la terapia o la capacidad del individuo de entender el procedimiento de la terapia psicológica, siendo estos últimos aspectos fundamentalmente importantes en la población de niños y adolescentes con TOC.

El tratamiento de elección en pacientes con una sintomatología leve-moderada consiste en la realización de una terapia psicológica. La psicoterapia más efectiva en pacientes con TOC es la denominada TCC incorporando la exposición con prevención de la respuesta (Öst et al., 2015; Rosa-

Alcázar et al., 2008). Esta terapia consiste en la exposición del paciente a los estímulos temidos que provocan ansiedad con la prohibición de realizar conductas de evitación (prevención de respuesta), de manera que los pacientes aprenden a manejar la ansiedad y a controlar las compulsiones. No obstante, según estudios recientes, aproximadamente el 30% de los pacientes pediátricos con diagnóstico de TOC que reciben tratamiento mediante TCC no presentan una mejoría clínica aceptable, definida como la reducción del 30% en la puntuación de la escala CY-BOCS (Franklin et al., 2015). Aunque existen distintas estrategias para aumentar la eficacia de la TCC, en la mayoría de los casos, los pacientes que no responden adecuadamente a esta terapia suelen recibir tratamiento farmacológico, en combinación con la psicoterapia. Además, en aquellos pacientes en que la sintomatología obsesivo-compulsiva sea de mayor gravedad o que presenten un alto grado de ansiedad o depresión, el tratamiento combinando la administración de psicofármacos y la TCC constituirá la primera estrategia terapéutica a seguir (Fenske et al., 2015; Hirschtritt et al., 2017).

Por lo que respecta al tratamiento farmacológico, la medicación de elección, tanto en niños como en adultos, son los ISRSs, tanto por su eficacia a la hora de reducir la sintomatología obsesivo-compulsiva como por su menor incidencia de efectos adversos (Hirschtritt et al., 2017; Ivarsson et al., 2015). Las guías de práctica clínica del TOC sugieren que el tratamiento óptimo de estos pacientes debe realizarse utilizando dosis elevadas del fármaco, con un aumento progresivo de la dosis hasta alcanzar la dosis efectiva, durante al menos de 8 a 12 semanas, debido al retraso en la aparición del efecto farmacológico. Además, se recomienda mantener el tratamiento con ISRSs durante los 6-12 meses posteriores a la remisión de los síntomas con el fin de evitar el riesgo de recaídas. No obstante, aunque estos fármacos han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la sintomatología obsesivo-compulsiva, algunos pacientes se muestran refractarios a la medicación o bien continúan presentando síntomas residuales a pesar de experimentar una cierta mejoría clínica. En estos casos, la sustitución del ISRS por otro antidepresivo, bien sea un ISRS distinto u otro tipo de antidepresivo como la clomipramina (antidepresivo tricíclico), o la adición al tratamiento de otros psicofármacos, como los antipsicóticos a dosis bajas, puede resultar de utilidad, permitiendo la mejoría de aproximadamente el 30% de los individuos refractarios (Fenske et al., 2015; Hirschtritt et al., 2017).

Entre los ISRSs, la fluoxetina, uno de los más prescritos, ha demostrado un mayor éxito en el tratamiento del TOC infantil, con una eficacia alrededor del 55-70% (Coskun and Zoroglu, 2009; Geller et al., 2003, 2001; Liebowitz et al., 2002; Rosa-Alcázar and Iniesta-Sepúlveda, 2013). Además de en el TOC, este fármaco también ha demostrado una gran eficacia y seguridad en el tratamiento

de niños y adolescentes con otros trastornos psiquiátricos como el trastorno depresivo mayor (TDM) o el trastorno de ansiedad generalizada (TAG) (Keeton et al., 2009; Usala et al., 2008). No obstante, existe una gran variabilidad en la respuesta terapéutica, con individuos que experimentan una gran mejoría, otros que mejoran levemente e individuos refractarios que no responden al tratamiento. Se calcula que entre el 30 y el 50% de los pacientes no experimentan una mejoría clínica adecuada en respuesta a la terapia con fluoxetina (Geller et al., 2001; Jenike, 2004). Por lo tanto, la capacidad de predecir la respuesta clínica al tratamiento con fluoxetina podría ser de gran utilidad a la hora de aplicar una medicina personalizada o de precisión, con el fin de seleccionar un tratamiento individualizado que permitiera alcanzar un mayor beneficio terapéutico y un mejor pronóstico en el menor tiempo posible, minimizando así el sufrimiento del paciente y los costes personales, sociales y económicos asociados a los múltiples intentos de tratamiento fallidos.

La variabilidad interindividual existente en la respuesta terapéutica constituye un fenotipo complejo que puede ser debido a causas de origen genético, ambiental, fisiológico o psicológico. Entre los distintos factores implicados, cabe destacar el papel que juegan las variantes genéticas, que representan un potencial biomarcador muy prometedor. Diversas evidencias demuestran que la respuesta terapéutica al tratamiento con antidepresivos presenta una elevada agregabilidad familiar (Drago et al., 2009). Así, en un estudio llevado a cabo por Franchini y colaboradores en el que se incluyeron 45 pacientes en tratamiento con fluvoxamina, un ISRS, y un familiar de primer grado para cada uno de ellos que estuviera recibiendo el mismo fármaco, se observó una tasa de concordancia en la respuesta terapéutica del 67% (Franchini et al., 1998). Además, se ha descrito que la variabilidad genética podría llegar a explicar hasta el 42% de las diferencias interindividuales observadas en la respuesta a estos fármacos (Tansey et al., 2013). No obstante, resulta improbable que una única mutación en un solo gen permita explicar la variabilidad en la respuesta terapéutica sino que, debido a que se trata de un fenotipo complejo, podrían estar implicados múltiples polimorfismos en diversos genes, con efectos individuales pequeños para cada uno de ellos. Además, estos efectos podrían no tener únicamente un efecto aditivo sobre otras variantes sino que podrían estar potenciando, contrarrestando o modificando los efectos de otros SNPs mediante interacciones recíprocas (Moore and Williams, 2009). Debido a la participación de estos factores genéticos en la respuesta terapéutica resulta importante identificar polimorfismos que permitan predecir la capacidad de experimentar una mejoría clínica tras el tratamiento farmacológico con fluoxetina.

1.3.1 Farmacogenética de la fluoxetina

El estudio del efecto de la variabilidad genética de un individuo en la respuesta terapéutica y en el riesgo de experimentar efectos adversos derivados de la medicación recibe el nombre de farmacogenética. Por lo que respecta al tratamiento con fármacos antidepresivos como la fluoxetina, diversos estudios han intentado identificar variantes genéticas asociadas con la mejoría clínica. En la tabla 3 puede verse un resumen de los principales genes candidatos asociados con la respuesta terapéutica a fluoxetina. Los estudios farmacogenéticos de la respuesta a fluoxetina y otros fármacos de su clase han utilizado fundamentalmente una estrategia basada en el análisis de genes candidatos implicados en los procesos farmacocinéticos o farmacodinámicos de los antidepresivos así como en el análisis de polimorfismos candidatos en base a su posible funcionalidad. Concretamente, la mayoría de estudios farmacogenéticos de la respuesta a los ISRS se han centrado principalmente en aquellos genes implicados en el metabolismo del fármaco: las isoformas CYP2D6 y CYP2C9 del citocromo P450, cuyas variantes alteran la capacidad metabólica del enzima pudiendo afectar, por tanto, a la disponibilidad de los fármacos y, por consiguiente, a su eficacia y tolerabilidad. Así, se ha demostrado que la variabilidad genética en *CYP2D6* condiciona los niveles plasmáticos de fluoxetina y su metabolito activo, la norfluoxetina (Gassó et al., 2014; Llerena et al., 2004; Scordo et al., 2005). Del mismo modo, las variantes genéticas del *CYP2C9* se han asociado con los niveles de fármaco en sangre (Llerena et al., 2004). No obstante, estos polimorfismos no parecen estar asociados con la respuesta clínica al tratamiento antidepresivo (Gassó et al., 2014; Hodgson et al., 2014; Peters et al., 2008). Por otro lado, los niveles plasmáticos de fármaco tampoco permiten predecir la respuesta terapéutica del paciente (Blázquez et al., 2014). Dado que la acción principal de la fluoxetina tiene lugar a nivel del sistema nervioso central, la biodisponibilidad del fármaco a nivel cerebral podría ser un mayor condicionante de la respuesta terapéutica que los niveles plasmáticos. En este sentido, en un estudio previo de nuestro grupo llevado a cabo en niños y adolescentes en tratamiento con fluoxetina hemos identificado que variantes génicas en el gen *ABCB1*, que codifica para la glicoproteína-P, implicada en el transporte de determinados antidepresivos, entre otros, a nivel de la barrera hematoencefálica, podrían estar asociadas con la mejoría clínica en estos pacientes (Gassó et al., 2014).

Por otro lado, entre los factores genéticos implicados en la respuesta clínica al tratamiento con fluoxetina, los genes relacionados con su farmacodinamia podrían jugar también un papel relevante, afectando a los procesos moleculares inducidos por el fármaco. La fluoxetina actúa específicamente inhibiendo la recaptación de serotonina a nivel neuronal, con el consiguiente aumento de la

disponibilidad del neurotransmisor a nivel de la sinapsis y la potenciación de la transmisión serotoninérgica. Por ello, entre los genes más estudiados a nivel farmacodinámico y que parece tener una mayor implicación en la respuesta al tratamiento con este fármaco se encuentra la diana terapéutica directa de los ISRSs, el transportador de serotonina (*SLC6A4*). Así, variantes genéticas en dicho gen, incluyendo el polimorfismo 5-HTTLPR, localizado en el promotor del gen e implicado en la transcripción génica, se han asociado con la respuesta a fluoxetina. Este polimorfismo consiste en una inserción/delección de 44pb que permite definir dos alelos distintos denominados L (alelo largo) y S (alelo corto, del inglés *small allele*), presentando el alelo L unos niveles de expresión de aproximadamente el doble que el alelo S. Se ha observado que los individuos portadores del alelo S parecen presentar una peor respuesta al tratamiento farmacológico, a pesar de que los resultados obtenidos en distintos estudios son dispares (Horstmann and Binder, 2009; Peters et al., 2004). Otros polimorfismos en el gen *SLC6A4* han sido también asociados con la respuesta terapéutica a fluoxetina (Keers et al., 2011). Además, los estudios de farmacogenética de la fluoxetina y otros ISRSs han explorado también el efecto de variantes genéticas localizadas en otros genes candidatos implicados en el sistema serotoninérgico en la mejoría clínica. Así, la respuesta al tratamiento con estos fármacos se ha asociado con la variabilidad en distintos genes como los receptores de serotonina (*HTR2A*, *HTR1B*, *HTR1A*) (Hong et al., 2006; Peters et al., 2004; Xu et al., 2012) o los enzimas implicados en la síntesis (*TPH1* y *TPH2*) (Kronenberg et al., 2008; Peters et al., 2004) y la degradación del neurotransmisor (*MAOA*) (Peters et al., 2004; Yu et al., 2005), entre otros.

Ahora bien, los efectos de la fluoxetina no se limitan a una modificación del sistema serotoninérgico sino que pueden verse también modificados otros sistemas de neurotransmisión además de otros procesos como el neurodesarrollo, el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) o las vías inflamatorias (Alboni et al., 2016; Perez-Caballero et al., 2014). En este sentido, se han evaluado diversos polimorfismos genéticos en genes candidatos relacionados con el sistema glutamatérgico (*GRIK2*, *GRIK4*, *GRIA3*), dopaminérgico (*DRD2*, *DRD4*, *COMT*) y noradrenérgico (*ADRB1*) o con las neurotrofinas (*BDNF*, *NTRK2*), entre otros.

Además del estudio de genes candidatos, se han llevado a cabo diversos estudios GWAS que han permitido identificar posibles genes asociados con la variabilidad interindividual en la respuesta terapéutica tras el tratamiento con ISRSs y otros antidepresivos. Así, se han propuesto genes como el receptor de efrina B1 (*EPHB1*), la cadherina 17 (*CDH17*) (Ising, 2009), la citoquina IL11 (Uher et al., 2010) o el receptor nuclear RORA (Garriock et al., 2010). Recientemente, se ha realizado un metanálisis incluyendo datos de tres estudios GWAS llevados a cabo en cohortes de pacientes en

tratamiento con ISRSs en el que se identificó que las señales más cercanas a la significación se encontraban en el gen de la neuroregulina 1 (*NRG1*) y el de la uridin fosforilasa 2 (*UPP2*) (Biernacka et al., 2016, 2015). No obstante, ninguna de las asociaciones identificadas en estos estudios GWAS ha resultado ser significativa tras las correcciones por múltiples comparaciones y ninguna de ellas ha sido replicada en estudios posteriores. Esta falta de asociaciones significativas puede ser debida a distintos factores. Por un lado, debido al gran número de variantes analizadas en este tipo de estudios, el tamaño muestral necesario para poder identificar asociaciones estadísticamente significativas es considerablemente elevado, lo cual resulta complicado en estudios farmacogenéticos debido a las dificultades tradicionales en el reclutamiento de pacientes. Por otro lado, existe una gran heterogeneidad intra- e inter-estudios por lo que respecta a las características socio-demográficas (edad, sexo, etnia, estatus socioeconómico), clínicas (diagnóstico, gravedad, edad de inicio) y farmacológicas (tipo de antidepresivo, dosis, tiempo de tratamiento, otros fármaco administrados) de las muestras utilizadas así como en la metodología utilizada para determinar el grado de respuesta al tratamiento, factores que pueden influir en el fenotipo observado y, por lo tanto, en los resultados obtenidos (Mas et al., 2015; Mas and Lafuente, 2009).

A pesar de los hallazgos descritos, las variantes y los genes candidatos identificados hasta el momento no permiten explicar toda la variabilidad interindividual observada en la mejoría clínica tras el tratamiento con fluoxetina, por lo que resulta necesario investigar nuevos genes candidatos que permitan predecir mejor la respuesta terapéutica. En este sentido, podría ser interesante evaluar la variabilidad genética en genes que se han visto relacionados con los efectos llevados a cabo por la fluoxetina, por ejemplo en base a los cambios de expresión inducidos por el fármaco tanto en animales de experimentación como en pacientes que reciben este tratamiento. Además, es importante tener en cuenta la amplitud de efectos de la fluoxetina tanto sobre los distintos sistemas de neurotransmisión como sobre otras vías y procesos. Por otro lado, los genes implicados en circuitos que no se han visto asociados con el tratamiento con fluoxetina pero sí con la fisiopatología de las enfermedades para las que se utiliza dicho fármaco, como el TOC, el TAG o el TDM, podrían ser considerados también nuevos genes candidatos. En este sentido, el abordaje farmacogenético desde un punto de vista más amplio basado en la exploración de múltiples genes pertenecientes a un mismo proceso biológico, en lugar de genes candidatos individuales, constituye una aproximación interesante ya que permite evaluar la variabilidad existente en distintos circuitos, mediante la selección de varios genes candidatos dentro de cada vía, que podrían verse modificados directa o indirectamente por la acción del fármaco y que, por tanto, podrían condicionar la mejoría clínica (Jia et al., 2011; Minguez and Dopazo, 2010).

Tabla 3. Principales genes candidatos asociados con la respuesta al tratamiento con fluoxetina y otros ISRS			
Gen	Función	Asociaciones descritas	Tipo antidepresivo
FARMACOCINÉTICA			
<i>CYP2D6</i>	metabolismo	Niveles plasmáticos de fluoxetina y sus metabolitos	Fluoxetina y otros ISRSs
<i>CYP2C9</i>	metabolismo	Niveles plasmáticos de fluoxetina y sus metabolitos	Fluoxetina
<i>CYP2C19</i>	metabolismo	Niveles plasmáticos de fármaco y sus metabolitos	ISRSs y otros antidepresivos
<i>ABCB1</i>	glicoproteína-P. Transportador de antidepresivos y otros fármacos en la BHE	Respuesta al tratamiento con fluoxetina y otros antidepresivos	Fluoxetina y otros antidepresivos (incluyendo otros ISRSs)
SISTEMA SEROTONINÉRGICO			
<i>SLC6A4</i>	Transportador de serotonina	S-HTTLPR y otros polimorfismos asociados con la respuesta terapéutica	Fluoxetina y otros antidepresivos (incluyendo otros ISRSs)
<i>HTR1A</i>	Receptor de serotonina pre y postsináptico	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	Fluoxetina y otros ISRSs
<i>HTR1B</i>	Receptor de serotonina presináptico	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	ISRSs y otros antidepresivos
<i>HTR2A</i>	Receptor de serotonina postsináptico	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	Fluoxetina y otros antidepresivos (incluyendo otros ISRSs)
<i>TPH1</i>	Biosíntesis de serotonina	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	Fluoxetina y otros ISRSs
<i>TPH2</i>	Biosíntesis de serotonina	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	Fluoxetina y otros antidepresivos (incluyendo otros ISRSs)
<i>MAOA</i>	Degradación de monoaminas (serotonina, dopamina y noradrenalina)	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	Fluoxetina y otros antidepresivos (incluyendo otros ISRSs)

Tabla 3. Continuación				
Gen	Función	Asociaciones descritas	Tipo antidepresivo	Referencia
OTROS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN				
<i>COMT</i>	Degradación de catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina)	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	Fluoxetina y otros antidepresivos (incluyendo otros ISRSs)	(Arias et al., 2006; Benedetti et al., 2010, 2009; Houston et al., 2011; Perlis et al., 2009; Tsai et al., 2009a; Vulink et al., 2012; Zai et al., 2014)
<i>GNB3</i>	Transducción de la señalización de distintos neurotransmisores	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	ISRSs y otros antidepresivos	(Hu et al., 2015; Joyce et al., 2003; Keers et al., 2011; Lee et al., 2004; Serretti et al., 2003; Wilkie et al., 2007)
<i>GRIK4</i>	Receptor de glutamato	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	ISRSs y otros antidepresivos	(Horstmann et al., 2010; Paddock et al., 2007; Pu et al., 2013)
<i>CNR1</i>	Receptor de endocannabinoides. Modulación de la neurotransmisión	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	ISRSs y otros antidepresivos	(Domschke et al., 2008a; Mitjans et al., 2013, 2012)
OTROS GENES				
<i>FKBP5</i>	Regulación de la afinidad del receptor de glucocorticoides	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	ISRSs y otros antidepresivos	(Binder et al., 2004; Ellsworth et al., 2013; Kirchheiner et al., 2008; Lekman et al., 2008; Zou et al., 2010)
<i>CRHR1</i>	Receptor de la hormona liberadora de corticotropina	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	Fluoxetina y otros antidepresivos (incluyendo otros ISRSs)	(Geng et al., 2014; Licinio et al., 2004; Liu et al., 2007; Perlis et al., 2013)
<i>BDNF</i>	Factor de crecimiento neuronal	Respuesta terapéutica al tratamiento antidepresivo	Fluoxetina y otros antidepresivos (incluyendo otros ISRSs)	(Chi et al., 2010; Choi et al., 2006; Gratacós et al., 2008; Murphy et al., 2013; Real et al., 2009)

BHE: barrera hematoencefálica; ISRSs: inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina

Por otro lado, además de la presencia de polimorfismos genéticos que determinan la variabilidad interindividual en la respuesta terapéutica, otros factores genéticos podrían estar también implicados en este fenotipo, entre los cuales destacan las modificaciones epigenéticas que, a diferencia de las variantes génicas, pueden verse reguladas por la interacción con factores ambientales. Las modificaciones epigenéticas incluyen, entre otros, la metilación del ADN o la modificación de histonas, procesos que resultan cruciales para el empaquetamiento del ADN y son fundamentales en la regulación de la expresión génica. En este sentido, los biomarcadores epigenéticos, especialmente los cambios en la metilación del ADN, en genes implicados en la farmacocinética o en la farmacodinamia han ido adquiriendo especial relevancia en los últimos años como potenciales predictores de la respuesta terapéutica (Majchrzak-Celińska and Baer-Dubowska, 2017). Así, recientemente Takeuchi y colaboradores identificaron que el perfil de metilación en los genes *PPFIA4* (liprina alfa, relacionada con la neurotransmisión) y *HS3ST1* (enzima implicado en la síntesis de heparán sulfato) se encontraba asociado con la respuesta al tratamiento con paroxetina (ISRS) (Takeuchi et al., 2017). Los niveles de metilación en otros genes como el transportador de serotonina también se han visto asociados con la respuesta terapéutica a los ISRSs (Domschke et al., 2014). No obstante, ningún estudio ha evaluado los efectos de la metilación génica en la mejoría clínica tras el tratamiento con fluoxetina.

En base a lo anterior, los factores genéticos y epigenéticos podrían jugar un papel crucial en la respuesta terapéutica a fluoxetina. No obstante, los estudios farmacogenéticos llevados a cabo hasta el momento han utilizado muestras heterogéneas con distintos tipos de antidepresivos en la mayoría de los casos y no han proporcionado resultados concluyentes. Dado que el principal antidepresivo utilizado en el tratamiento del TOC es la fluoxetina, resulta necesario llevar a cabo estudios más específicos centrados en el uso de este fármaco, que permitan identificar biomarcadores genéticos de la respuesta terapéutica con el fin de poder aplicar una medicina de precisión mediante la selección del fármaco adecuado desde el inicio del tratamiento, evitando así el uso de múltiples ensayos sin éxito y mejorando el pronóstico y la calidad de vida del paciente.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La presente tesis se ha llevado a cabo en base a dos hipótesis diferenciadas relacionadas con la fisiopatología y la farmacología del TOC:

Hipótesis 1: Fisiopatología del TOC de inicio en la infancia y la adolescencia

Estudios previos demuestran la participación de mecanismos neuroinmunitarios, especialmente relacionados con la inmunidad innata, incluyendo tanto a los monocitos como a la microglía, en la fisiopatología de las enfermedades neuropsiquiátricas, entre ellas el TOC. Esta disregulación inmunológica podría estar presente tanto en condiciones fisiológicas como en respuesta a estímulos inflamatorios entre los que se encuentran los agentes infecciosos o la exposición a estrés psicosocial, y podría ponerse de manifiesto tanto por la presencia de factores genéticos de susceptibilidad como por un fenotipo celular de carácter más proinflamatorio y menos neuroprotector. En consecuencia se estaría produciendo un exceso de neurotoxicidad y/o un déficit de neuroprotección.

Dado que los monocitos y las células de la microglía derivan de la misma estirpe progenitora mieloide y comparten las vías de señalización intracelulares activadas durante la estimulación inmunitaria, los monocitos podrían ser un modelo periférico útil, capaz de reflejar los procesos celulares que tienen lugar en el cerebro, sugiriendo así que las posibles alteraciones periféricas podrían darse también a nivel central.

En concreto, en la presente tesis se plantea que los pacientes con TOC de inicio en la infancia y la adolescencia presentarán una predisposición proinflamatoria en comparación con los individuos control. Así, existirán diferencias en la frecuencia de determinados alelos en los genes HLA entre casos y controles. Además, los pacientes con TOC tendrán una mayor proporción de monocitos proinflamatorios que los individuos control. Finalmente, los cultivos primarios de monocitos de estos pacientes secretarán cantidades superiores de citoquinas proinflamatorias y presentarán una expresión alterada de genes relacionados con la regulación de los procesos inmunitarios y la inflamación, tanto en condiciones basales como tras la exposición a estímulos inflamatorios.

Hipótesis 2: Respuesta terapéutica al tratamiento con fluoxetina en niños y adolescentes

La fluoxetina representa la principal terapia farmacológica utilizada en el TOC. No obstante, a pesar de haber demostrado ser eficaz en el tratamiento de este trastorno en niños y adolescentes, existe una gran variabilidad en la respuesta terapéutica, con un alto número de pacientes que no experimentan una mejoría clínica adecuada tras el tratamiento farmacológico. Esta variabilidad interindividual está determinada, entre otros, por factores genéticos.

En concreto, la presente tesis plantea que la respuesta clínica podría estar determinada por factores genéticos implicados en la farmacodinamia de la fluoxetina, no solo en genes relacionados con el sistema serotoninérgico, implicado en el mecanismo de acción directo del fármaco, sino también en otros sistemas de neurotransmisión y otros procesos biológicos que podrían verse modificados por la acción de la fluoxetina, como el eje HPA, los procesos del neurodesarrollo, las vías inflamatorias y los ritmos circadianos.

2.2 Objetivos

Para dar respuesta a las hipótesis planteadas se han propuesto los siguientes objetivos:

Objetivo 1

Profundizar en los mecanismos inmunopatogénicos implicados en el desarrollo del TOC de inicio en la infancia y la adolescencia, poniendo especial énfasis en la desregulación de los monocitos. En particular, nos planteamos:

- A. Explorar la variabilidad alélica existente en los genes HLA de clase II, específicamente en *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1*, en una población de TOC y su posible asociación con la susceptibilidad a padecer el trastorno (*Estudio 1*).
- B. Realizar una caracterización de los monocitos y de su funcionalidad en pacientes con TOC y en individuos control (*Estudio 2*). Concretamente, se pretende:
 - Caracterizar la distribución de las distintas poblaciones de monocitos circulantes.
 - Estudiar las diferencias en la producción de citoquinas proinflamatorias y en los perfiles de expresión génica en cultivos primarios de monocitos, tanto en condiciones basales como en respuesta a agentes inmunoreguladores.
 - Explorar la relación existente entre los parámetros inmunológicos estudiados y las características clínicas de los pacientes pediátricos con TOC.

Objetivo 2

Identificar marcadores farmacogenéticos relacionados con la respuesta terapéutica a fluoxetina en niños y adolescentes. En concreto, se pretende evaluar la influencia de polimorfismos genéticos y variantes epigenéticas en genes relacionados con la farmacodinamia de la fluoxetina en la mejoría clínica observada en pacientes pediátricos después del tratamiento con dicho fármaco (*Estudios 3 y 4*).

MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

Las particularidades del material y métodos se describen de manera detallada en cada uno de los estudios que componen el trabajo de la presente tesis. A continuación se resumen los principales aspectos referentes a los participantes y a la metodología clínica y experimental utilizada.

3.1 Participantes

Los participantes fueron reclutados en el Servicio de Psiquiatría y Psicología Infantil y Juvenil del Instituto de Neurociencias del Hospital Clínic de Barcelona. El periodo de reclutamiento se extendió desde enero de 2010 hasta julio de 2014. Todos los pacientes incluidos en el estudio tenían una edad comprendida entre los 8 y los 19 años. El diagnóstico se llevó a cabo por psiquiatras especialistas de acuerdo con los criterios establecidos en el DSM-IV (APA, 1994). Los criterios de exclusión incluyeron la presencia de retraso mental, trastornos neurológicos y trastornos psicóticos. Para los estudios genéticos, además, se excluyeron los individuos de etnia no caucásica mientras que para el *estudio 2* (caracterización de monocitos) se excluyeron los individuos que presentaban o habían presentado recientemente procesos inflamatorios. Por lo que respecta a la intervención terapéutica, el tratamiento de cada paciente fue decidido por el psiquiatra responsable siguiendo los protocolos de actuación y las guías clínicas del servicio. En la figura 4 se muestra la distribución de los pacientes incluidos en los distintos estudios.

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Clínic de Barcelona. Todos los sujetos y sus padres fueron informados en detalle sobre los procedimientos que se llevarían a cabo durante el estudio. Todos los participantes dieron su consentimiento verbal mientras que los padres firmaron un consentimiento por escrito.

Estudio 1 (Genética HLA)

Para la realización de este estudio se reclutaron un total de 144 pacientes diagnosticados de TOC. Uno de los pacientes fue excluido por el hecho de presentar antecedentes de etnia no caucásica.

Como muestra de referencia se seleccionaron dos poblaciones control de la base de datos *The Allele Frequency Net Database* (<http://www.allelefrequencys.net/>) que fueran geográficamente cercanas

a nuestra muestra de pacientes con TOC y para las que se dispusiera de información sobre las frecuencias alélicas para los genes *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1*. Así, para el análisis de los alelos DRB1 se utilizó una muestra de referencia de 941 individuos procedentes del Banco de Sangre de Cordón Umbilical de Barcelona (Vidal et al., 2002). El análisis de los alelos DQB1 se llevó a cabo utilizando una muestra de referencia con 280 donantes de sangre sanos originarios de Granada (Pascual et al., 2001).

Estudio 2 (Caracterización de monocitos)

El grupo de pacientes constó de 102 individuos diagnosticados de TOC. Además, se incluyeron 47 individuos control, con edades comprendidas entre los 11 y los 18 años, reclutados en colegios de la misma área geográfica que los pacientes incluidos en el estudio. Para descartar la presencia de enfermedades psiquiátricas actuales o pasadas en los individuos control, se administró la versión española (Ulloa et al., 2006) de la entrevista clínica semi-estructurada K-SADS-PL (del inglés, *The Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version*) (Kaufman et al., 1997) tanto a los niños como a los padres. Los criterios de exclusión para los controles incluyeron la presencia de retraso mental, trastornos psiquiátricos o neurológicos y procesos inflamatorios.

Debido a la sensibilidad de las técnicas experimentales utilizadas para la determinación de los parámetros inmunológicos no se pudo obtener información para algunas muestras. El número total de individuos analizados en cada caso se muestra en la figura 4.

Estudios 3 y 4 (Farmacogenética de la fluoxetina)

Para la realización de estos estudios se pretendía reclutar una cohorte de pacientes que iniciaran por primera vez tratamiento con fluoxetina y que no hubieran recibido previamente tratamiento con ningún otro fármaco antidepresivo. Debido a que únicamente 16 de los pacientes con TOC se encontraban en esta situación, se permitió la inclusión de individuos con otros diagnósticos psiquiátricos principales para los que este fármaco también está indicado. Así, la muestra incluyó un total de 16 individuos con diagnóstico principal de TOC (19.3%), 57 individuos con TDM (68.7%) y 10 individuos con TAG (12%). Cabe destacar que, en el conjunto de la muestra, más del 50% de los individuos presentaban síntomas obsesivo-compulsivos de grado patológico. Los pacientes reclutados fueron tratados con el fármaco durante 12 semanas, momento en el que se procedió a

evaluar la respuesta terapéutica mediante el uso de diferentes escalas clínicas. Algunos individuos recibieron comedición con antipsicóticos (15.6%), benzodiacepinas (10.8%) o estabilizadores del ánimo (2.4%) en algún momento del estudio. En algunos casos concretos no se pudieron cumplimentar algunas de las escalas de evaluación de la respuesta terapéutica por lo que el tamaño final de la muestra se redujo. El número total de individuos para cada escala puede verse en la figura 4.

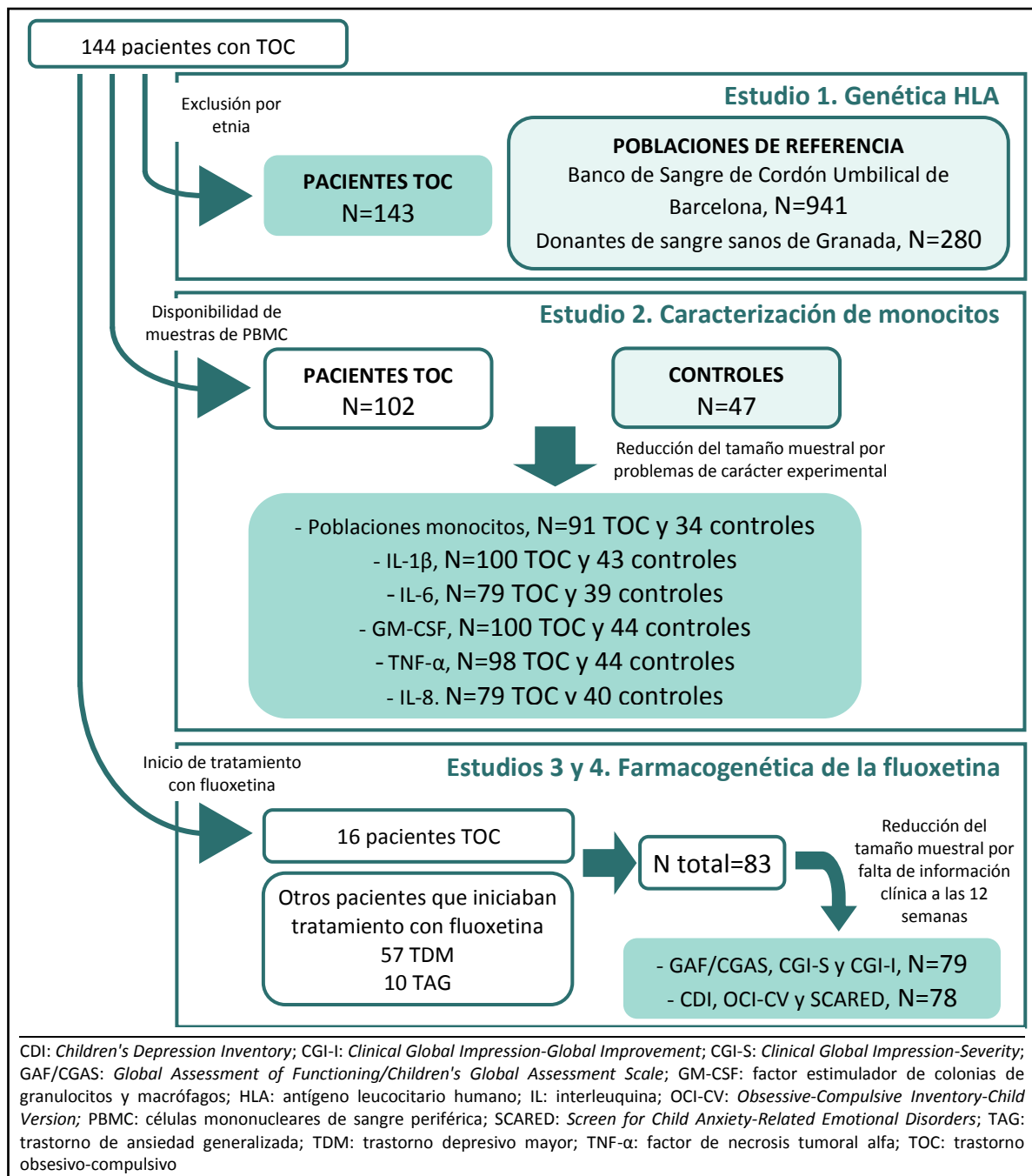


Figura 4. Esquema del reclutamiento y distribución de los individuos incluidos en cada uno de los estudios.

3.2 Evaluación clínica

Con el fin de determinar la presencia de trastornos psiquiátricos actuales o pasados en los pacientes incluidos en los distintos estudios que conforman esta tesis, se utilizó la versión española (Ulloa et al., 2006) de la entrevista semi-estructurada K-SADS-PL (Kaufman et al., 1997). Esta entrevista se administró a ambos padres y al niño en el momento de admisión.

La evaluación de la severidad de la enfermedad al inicio del estudio se llevó a cabo mediante el uso de distintas escalas clínicas. La gravedad de la sintomatología obsesivo-compulsiva se evaluó en el momento de admisión mediante la escala CY-BOCS. Puntuaciones por encima de 16 sugieren diagnóstico de TOC (Scahill et al., 1997). Además, se administró el Inventario Obsesivo-Compulsivo Versión de Niños (OCI-CV, del inglés *Obsessive-Compulsive Inventory-Child Version*), cuestionario de 21 ítems que evalúa la presencia de síntomas obsesivos y compulsivos en niños y adolescentes durante el mes anterior. Las puntuaciones iguales o superiores a 17 son indicativas de la presencia de estos síntomas (Foa et al., 2010).

La sintomatología depresiva se evaluó mediante el Inventario de Depresión Infantil (CDI, del inglés *Children's Depression Inventory*), un autoinforme de 27 ítems que permite evaluar los síntomas depresivos en niños y adolescentes. Puntuaciones por encima de 19 son indicativas de síntomas depresivos patológicos (Kovacs, 1992).

El instrumento autoinformado SCARED (del inglés, *Screen for Child Anxiety-Related Emotional Disorders*) se utilizó para evaluar la presencia de trastornos de ansiedad. Una puntuación total igual o superior a 25 determina la presencia de síntomas ansiosos patológicos (Birmaher et al., 1997).

Además, se evaluó el estado global del paciente y su funcionalidad mediante la administración de las escalas GAF/CGAS (del inglés, *Global Assessment of Functioning/Children's Global Assessment Scale*) y CGI-S (del inglés, *Clinical Global Impression-Severity*). La escala GAF (Luborsky, 1962) y la CGAS (Shaffer et al., 1983) son escalas numéricas cuya puntuación va del 1 al 100 y que permiten evaluar la actividad psicológica, social y laboral del paciente. Las puntuaciones por encima de 70 se consideran dentro del rango de normalidad funcional. La escala CGAS se administró a pacientes con edades inferiores a los 12 años. Por lo que respecta a la CGI-S (Guy, 1976), evalúa la gravedad global de la sintomatología en una escala que va del 1 (normal, no enfermo) al 7 (extremadamente enfermo).

Tras 12 semanas de tratamiento con fluoxetina (*estudios 3 y 4*) se procedió a evaluar la respuesta terapéutica. Para ello, se volvieron a administrar las mismas escalas (CY-BOCS, OCI-CV, CDI, SCARED, GAF/CGAS y CGI-S). La mejoría clínica se determinó como la diferencia entre las puntuaciones basales en dichas escalas y las obtenidas pasadas 12 semanas. Además, se utilizó la escala CGI-I (del inglés, *Clinical Global Impression-Global Improvement*) (Guy, 1976), administrada tras 12 semanas de tratamiento, que permite evaluar la respuesta clínica. Se trata también de una escala que puede adquirir hasta siete valores: 1=mucho mejor, 2= bastante mejor, 3=mínimamente mejor, 4=sin cambios, 5=mínimamente peor, 6= bastante peor y 7=mucho peor.

3.3 Caracterización de monocitos en pacientes con TOC de inicio en la infancia y la adolescencia (*Estudio 2*)

En el *estudio 2* se analizó, por un lado, la distribución de las subpoblaciones de monocitos circulantes mediante citometría de flujo. Además, se evaluó la funcionalidad de estos monocitos mediante el cultivo primario de éstos en presencia de agentes reguladores de la inflamación. Concretamente, se utilizó lipopolisacárido (LPS), el principal componente de la pared de bacterias Gram-negativas, capaz de activar la respuesta inmunitaria, y dexametasona, un glucocorticoide con propiedades antiinflamatorias. Finalmente, se evaluó la posible relación entre los parámetros inmunológicos que se encontraron asociados con el TOC y las variables clínicas como la severidad de la enfermedad, la duración o la presencia de tratamiento farmacológico.

3.3.1 Evaluación de las poblaciones de monocitos mediante citometría de flujo

A partir de muestras de sangre periférica de los pacientes con TOC y de los individuos control recogidas en tubos BD Vacutainer que contenían ácido cítrico dextrosa (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) mediante centrifugación de gradiente de densidad sobre reactivo de Ficoll (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Suecia). Las células se mantuvieron almacenadas en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización.

Tras una rápida descongelación de las células criopreservadas, se tomó una alícuota de al menos 50 000 células para el análisis de las poblaciones de monocitos. Estas células fueron marcadas con tinción de viabilidad (eBioscience, San Diego, CA, USA) seguida de la incubación con anticuerpos

anti-HLA-DR-V500, anti-CD14-Pe-Cy7 y anti-CD16-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). A continuación, las células marcadas fueron analizadas mediante citometría de flujo en un citómetro BD FACSCanto II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) utilizando la compensación adecuada para corregir el solapamiento de espectros y la autofluorescencia. Los datos se analizaron con el software FlowJo versión 10.1r5 (Ashland, OR, USA). En la figura 5 se muestra la estrategia utilizada para delimitar las poblaciones de monocitos. En primer lugar se seleccionó la supuesta población de monocitos en base al perfil de dispersión de la luz (*forward* y *side scatter*). A continuación, tras seleccionar el grupo de células viables, se diferenció el grupo de monocitos del resto de leucocitos en base a la elevada expresión de HLA-DR. Finalmente, se identificaron las tres subpoblaciones de monocitos de acuerdo a los niveles de expresión de los marcadores CD14 y CD16: monocitos clásicos (CD14^{alto}CD16⁻), intermedios (CD14^{alto}CD16^{bajo}) y no clásicos (CD14^{bajo}CD16^{alto}). La combinación de monocitos intermedios y no clásicos en una única población se denominó monocitos CD16+. Los monocitos totales se definieron como la suma de los subgrupos clásico, intermedio y no clásico. Para el análisis estadístico se calcularon los porcentajes de cada una de las poblaciones descritas. Únicamente se tuvieron en cuenta las muestras con un recuento total de monocitos de al menos 200 células.

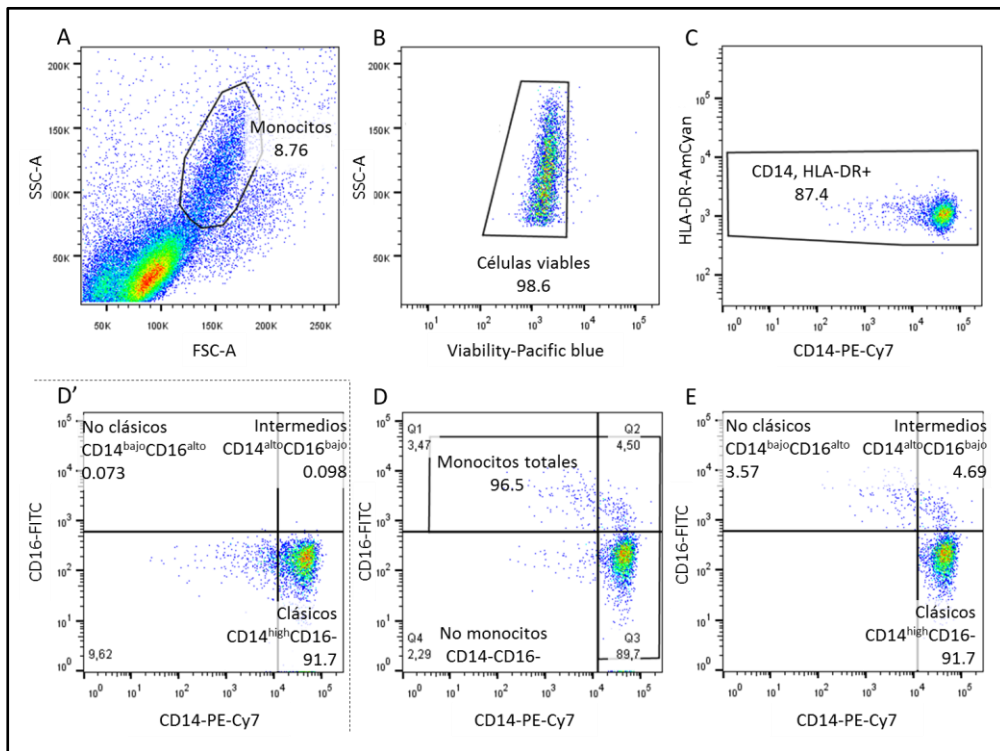


Figura 5. Estrategia de selección de las distintas subpoblaciones de monocitos (A-E). La figura D' muestra el marcaje de la muestra para los marcadores CD14 y CD16 en ausencia de anticuerpos anti-CD16 con el fin de determinar el límite de detección para este marcador.

3.3.2 Cultivo primario de monocitos y determinación de su funcionalidad

La evaluación de la funcionalidad de los monocitos de pacientes con TOC y los sujetos control se llevó a cabo mediante el cultivo primario de dichas células. Para ello, se purificaron los monocitos a partir de las muestras de PBMC mediante un sistema de selección negativa utilizando un marcaje magnético indirecto (MACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), que permitió obtener simultáneamente la población de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos. No fue posible purificar monocitos para una muestra de un paciente y una de un control, a pesar de seguir el mismo protocolo. Los monocitos purificados fueron sembrados a una densidad de 1.5×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos y cultivados en un incubador humidificado con un 5% de CO₂ a 37°C. Tras 2 h de reposo, los monocitos fueron preincubados durante 30 minutos con o sin dexametasona 100 nM seguida de la estimulación con LPS 1 ng/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo, USA) durante 24 h. Como control negativo se utilizó medio de cultivo estéril. Tras la incubación, los sobrenadantes se almacenaron a -20°C y las células a -80°C hasta el posterior análisis.

A continuación, para determinar la funcionalidad de los monocitos se utilizaron dos estrategias: por un lado se cuantificaron los niveles de citoquinas liberados en el medio de cultivo y por el otro se evaluó el perfil de expresión génica mediante *microarrays*.

Para la cuantificación de las citoquinas liberadas por los monocitos en condiciones basales y tras la exposición a LPS solo (LPS) o en combinación con dexametasona (LPS+DEX) se utilizó un inmunoensayo multiplex, mediante la tecnología Luminex xMAP® (Luminex, Austin, TX, USA), que permitió determinar simultáneamente los niveles de cinco citoquinas proinflamatorias [IL-1 β , IL-6, GM-CSF (del inglés, *granulocyte-macrophage colony stimulation factor*), TNF- α e IL-8] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en el medio de cultivo. Todas las muestras y los estándares se analizaron por duplicado. Los datos fueron adquiridos utilizando un sistema Luminex 200 y analizados mediante el software xPonent v3.1 (Luminex, Austin, TX, USA). Para la cuantificación se utilizó una curva estándar de referencia.

Para evaluar el grado de activación inflamatoria de los monocitos tras la exposición a estímulos, se calcularon los porcentajes de la producción de citoquinas respecto a las muestras no tratadas para cada una de las citoquinas tras el tratamiento con LPS y con LPS+DEX. Además, para estimar la sensibilidad de los monocitos a la dexametasona, se calcularon las diferencias de concentración entre la muestra tratada con LPS y la muestra tratada con LPS+DEX; estas diferencias se expresaron en forma de porcentaje respecto a los niveles de citoquinas tras la estimulación con LPS.

Para el estudio de los perfiles de expresión génica en los cultivos primarios de monocitos (resultados pendientes de ser publicados) se seleccionaron un total de 8 individuos diagnosticados de TOC y 8 individuos control de entre todos los participantes del *estudio 2*, en base a los resultados obtenidos en dicho estudio. Así, se priorizaron los pacientes y los controles que presentaban un mayor y un menor estado proinflamatorio, respectivamente.

Para el análisis de los niveles de expresión mediante *microarrays*, el ARN se obtuvo a partir de los sedimentos celulares utilizando el reactivo de TRIzol (Life Technologies, Foster City, CA, USA). La pureza e integridad del ARN se determinaron mediante un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Seguidamente, las muestras fueron procesadas e hibridadas en las placas de array *Human PrimeView* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) en el centro Kompetenzzentrum für Fluoreszenz Bioanalytik (KFB, BioPark Regensburg GmbH, Regensburg, Alemania). Dos muestras (una de un paciente con TOC y la otra de un individuo control, ambas tras el tratamiento con LPS) no pudieron ser hibridadas por motivos de calidad y cantidad del ADN codificante. En consecuencia, se hibridaron y analizaron un total de 30 muestras: 16 para los monocitos no tratados (8 pacientes y 8 controles) y 14 para los monocitos estimulados con LPS (7 pacientes y 7 controles).

3.4 Estudio de marcadores genéticos y epigenéticos del TOC y de la respuesta a fluoxetina (*Estudios 1, 3 y 4*)

Para el estudio de las variantes genéticas, el ADN genómico fue aislado a partir de sangre entera mediante el sistema automático MagNA Pure LC (Roch Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La concentración y la calidad del ADN se midieron espectrofotométricamente utilizando un NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Surrey, UK).

Estudio 1 (Genética HLA)

En este estudio se evaluó la posible asociación entre la variabilidad alélica existente en los genes HLA de clase II y el riesgo de padecer TOC. Para ello, de entre los distintos genes HLA de clase II, se seleccionaron dos (*HLA-DRB1* y *HLA-DQB1*) en base a las asociaciones establecidas en la literatura entre estos genes y las enfermedades psiquiátricas y autoinmunes. Para el tipaje de estos dos genes en los pacientes con TOC se utilizaron kits de tipaje HLA Lifecodes (Immucor, Stamford, CT, USA). El

método consistió en la amplificación de ambas secuencias mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de la hibridación en una plataforma Luminex (Luminex, USA) utilizando sondas de oligonucleótidos específicas. Los alelos² HLA de cada individuo fueron asignados mediante el programa MatchIT DNA (Immucor).

Además de evaluar las diferencias existentes en la frecuencia de cada uno de los alelos identificados en nuestra población entre el grupo de pacientes con TOC y la población de referencia correspondiente, se evaluó también si el hecho de presentar alguno de los alelos de riesgo (alelos 04:01, 04:04 y 04:05) del serotipo³ HLA-DR4 del gen *HLA-DRB1*, previamente asociados con enfermedades psiquiátricas y autoinmunes, aumenta el riesgo de padecer TOC.

Estudios 3 y 4 (Farmacogenética de la fluoxetina)

Para el *estudio 3* se llevó a cabo una selección de genes candidatos relacionados con la farmacodinamia de la fluoxetina en base a las evidencias clínicas, experimentales y/o farmacogenéticas sobre la implicación de dichos genes en diferentes vías relacionadas directa o indirectamente con la respuesta a fluoxetina. Así, se seleccionaron un total de 47 genes candidatos implicados en seis procesos distintos (tabla 4).

Tabla 4. Genes y sistemas seleccionados para el estudio farmacogenético (estudio 3)	
Sistemas	Genes^a
Sistema serotoninérgico	<i>MTHFR, TPH1, TPH2, MAOA, SLC6A4, HTR1A, HTR1B, HTR2A, HTR2C, HTR3A</i>
Otros sistemas de neurotransmisión	<i>CNR1, GRIK4, ACE, COMT, KCNK2, PPP1R1B, GNB3</i>
Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	<i>CRHR1, CRHR2, NR3C1, NR3C2, FKBP5, AVPR1B, CRHBP, UCN3</i>
Neurodesarrollo	<i>NTRK2, BDNF, CREB1, GSK3B, DTNBP1</i>
Vías inflamatorias	<i>NOS1, PSMB4, IL1B, SERPINE1, STAT3, TGFB1, MIF</i>
Ritmos circadianos	<i>NPAS2, CLOCK, ARNTL, RORA, RORB, CRY2, MTNR1A, MTNR1B</i>
Estudios de asociación genómica (GWAS)	<i>EPHB1, CDH17</i>

^a Para más información acerca de la función de estos genes ver tabla 2 del estudio 3 (página 116)

² En el estudio de la variabilidad genética de los genes HLA se denomina alelo a la secuencia específica del gen que incluye una combinación de distintos polimorfismos concretos.

³ En el estudio de los alelos HLA se denomina serotipo al conjunto de alelos de un gen que presentan una secuencia muy similar por lo que dan lugar a proteínas que pueden ser reconocidas por un mismo anticuerpo *in vitro*.

En cuanto a los polimorfismos, se seleccionaron un total de 381 SNPs distribuidos entre los 47 genes candidatos siguiendo tres estrategias distintas. Por un lado, se incluyeron polimorfismos para los que existe evidencia científica descrita en la literatura sobre su asociación con la respuesta a la fluoxetina y otros fármacos de su clase. Por otro lado, se seleccionaron variantes genéticas con una frecuencia alélica mínima (MAF) superior al 10% en la población caucásica en base a su posible funcionalidad según su localización a lo largo de la secuencia génica y de acuerdo con la información publicada en las bases de datos *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>), *dbSNP* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) y *PupaSuite 3* (<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es/>). Por último, se utilizó una estrategia de selección basada en la inclusión de SNPs marcadores informativos de la variabilidad existente a lo largo de toda la región genómica (ampliada 10 kb por los extremos 5' y 3' para tener en cuenta la posible existencia de regiones reguladoras). La selección de estos SNPs se llevó a cabo a partir de la información del *International Haplotype Mapping Project* (HapMap fase II, <http://www.hapmap.org>) utilizando el software Haploview 4.2 (Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA). Se seleccionó el mínimo número de marcadores (con una MAF superior al 10% y sin SNPs vecinos a menos de 20 pares de bases) que permitiera cubrir el 98% de la variabilidad genética utilizando como referencia la población caucásica CEU (residentes en Utah de la muestra CEPH con antepasados del norte y oeste de Europa).

Los SNPs seleccionados fueron genotipados en el nodo de Santiago de Compostela del Centro Nacional de Genotipado Español mediante la tecnología MassArray de Sequenom (Sequenom, San Diego, CA, USA). Tras el genotipado, se excluyeron varios SNPs por no superar el control de calidad del genotipado (N=33), porque eran monomórficos (N=1) o presentaban una MAF inferior al 10% (N=13) o bien por encontrarse fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.05$; N=18). En consecuencia, para el análisis de asociación farmacogenético se utilizaron un total de 316 SNPs validados distribuidos entre 45 genes candidatos.

Por lo que respecta al *estudio 4*, se focalizó en profundizar en los factores genéticos y epigenéticos que podrían afectar a los niveles de expresión del gen *HTR1B*, asociado con la respuesta a fluoxetina en el estudio anterior, y que por lo tanto, podrían estar influyendo en la mejoría clínica tras el tratamiento con dicho fármaco. Para ello, se seleccionaron SNPs específicamente localizados en lugares de unión a factores de transcripción (TFBSs, del inglés *Transcription Factor Binding Sites*). Se identificaron 38 SNPs y 119 TFBSs en la región génica de *HTR1B*. Un total de 9 SNPs estaban específicamente localizados en TFBSs. Finalmente, se seleccionaron un total de tres SNPs (rs9361233, rs6297 y rs9361235) que tenían una MAF superior al 10% en la población caucásica y

que no habían sido genotipados previamente en nuestra población. El genotipado se llevó a cabo utilizando ensayos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mediante el sistema de PCR a tiempo real 7500 de Applied Biosystems (Warrington, UK). Además, se evaluó si los niveles de metilación del gen estaban asociados con la respuesta terapéutica. Para ello, se identificó, mediante la base de datos *UCSC Genome Browser* (www.genome.ucsc.edu), una isla CpG en el promotor del gen *HTR1B*, que contenía 131 CpGs a lo largo de 1861 pares de bases. Para el estudio se seleccionó una región con alta densidad de CpGs (un total de 7 lugares CpG). El ADN genómico fue modificado con bisulfito utilizando el kit de conversión con bisulfito Epiect Plus (Qiagen). A continuación, se amplificó el ADN convertido mediante el kit Pyro Mark PCR (Qiagen). Las posiciones CpG se detectaron mediante reacciones de secuenciación en un sistema de pirosecuenciación (Tost and Gut, 2007) utilizando los reactivos Pyro Mark Gold Q96 y el pirosecuenciador Pyrosequencer Analyzer PyroMark Q96 (Qiagen).

3.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software IBM SPSS statistics versión 20 (IBM Corp., Chicago, Illinois, USA). Se evaluó la normalidad de las variables continuas mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk. Para identificar aquellos factores sociodemográficos y clínicos que pudieran tener un efecto sobre las variables evaluadas, se utilizaron las pruebas de correlación de Pearson o Spearman, la prueba T de Student, el análisis ANOVA, la *U* de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis, de acuerdo con la distribución de cada una de las variables. El análisis de variables categóricas se realizó mediante el test de Chi cuadrado. Los factores que resultaron significativamente asociados con las variables de estudio se utilizaron como variables de ajuste en los análisis estadísticos subsiguientes.

Los análisis estadísticos específicos utilizados para cada uno de los estudios se describen en detalle más adelante.

Estudio 1 (Genética HLA)

La frecuencia de los alelos HLA se evaluó mediante el paquete “*genetics*” para R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). A continuación, para cada alelo con una MAF superior al 1%, se determinaron las diferencias existentes entre el grupo de pacientes con TOC y la población de

referencia correspondiente mediante la prueba Chi cuadrado, con el correspondiente cálculo de las *odds ratio* y de los intervalos de confianza del 95%.

Estudio 2 (Caracterización de monocitos)

Dado que los diferentes parámetros inmunológicos determinados en este estudio (porcentajes de las subpoblaciones de monocitos y niveles de las cinco citoquinas en las distintas condiciones evaluadas) presentaron una distribución no normal, se procedió a la transformación logarítmica de los datos previa a la realización del análisis estadístico. Para evaluar las posibles diferencias existentes en dichos parámetros entre casos y controles se utilizaron modelos lineales generales ajustados por edad y sexo. Las comparaciones *post-hoc* se realizaron utilizando el test de Bonferroni.

Para el estudio de los perfiles de expresión (resultados pendientes de ser publicados), los datos obtenidos en el *microarray* fueron normalizados utilizando el análisis robusto multi-chip y analizados mediante el software Babelomics 5 (<http://www.babelomics.org/>) (Alonso et al., 2015). Para aquellos genes evaluados mediante distintas sondas, se calculó el valor de expresión promedio de las sondas correspondientes. Las diferencias en los niveles de expresión génica se detectaron mediante el paquete Limma de Babelomics. Además, se calculó el nivel de cambio en la expresión para cada uno de los genes entre casos y controles (*fold change*). En base a los resultados obtenidos, se priorizaron aquellos genes que presentaban un valor de p corregido por el método del *false discovery rate* (FDR) inferior a 0.01 y un valor absoluto de $\log(\text{fold change})$ superior o igual a 2.

Con el fin de determinar la posible interconexión existente entre los genes diferencialmente expresados entre casos y controles tanto en condiciones basales como tras la estimulación de los monocitos cultivados con LPS se construyó una red de interacción proteína-proteína utilizando la base de datos STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) (<https://www.string-db.org/>), que integra la información procedente de diversas evidencias empíricas e *in silico* sobre las interacciones entre proteínas (Szklarczyk et al., 2017).

Por otro lado, para proporcionar una interpretación funcional de las diferencias observadas entre casos y controles en los niveles de expresión génica, se llevó a cabo un análisis funcional mediante la base de datos DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Huang et al., 2007). Este aplicativo describe qué procesos biológicos (*GO terms*) se encuentran específicamente enriquecidos en la lista de genes de interés (Ashburner et al., 2000) y los agrupa en módulos funcionales. El valor de p y el valor de enriquecimiento reflejan el

grado de enriquecimiento del módulo a partir del listado de genes diferencialmente expresados proporcionado. En el análisis, se priorizaron los módulos con valores de enriquecimiento superiores a 2 y que contenían tres o más procesos biológicos significativos (valor de p corregido por el método del FDR inferior a 0.05). Los resultados derivados del análisis funcional se representaron mediante el paquete de R “*FGNet*”, que permite visualizar la relación existente entre los distintos módulos y los distintos procesos biológicos que contienen.

Estudios 3 y 4 (Farmacogenética de la fluoxetina)

Para estimar el efecto independiente de cada SNP en la mejoría clínica, se utilizaron modelos lineales generales ajustados por el diagnóstico y por el valor basal correspondiente para cada escala de evaluación clínica. Se escogió el mejor modelo de herencia (codominante, dominante, recesivo, supradominante o aditivo) mediante el criterio de información de Akaike (AIC). Además, para los genes significativamente asociados con la respuesta terapéutica en el análisis de SNPs individuales se llevó a cabo un análisis de haplotipos. Ambos análisis se realizaron utilizando el paquete de R “*SNPassoc*”.

Para el análisis de los niveles de metilación, se calculó el nivel medio de metilación entre las siete posiciones CpG de la región analizada y se evaluaron las correlaciones parciales entre dichos niveles y la mejoría clínica. Las correlaciones se ajustaron por el diagnóstico y la puntuación basal de la escala correspondiente.

Corrección por comparaciones múltiples

Debido al alto número de comparaciones realizadas en los estudios de asociación genética (*estudios 1, 3 y 4*) y de expresión génica (estudio de *microarrays*) la probabilidad de aparición de falsos positivos aumenta, por lo que se aplicaron las correcciones para múltiples comparaciones más habituales para este tipo de análisis. Así, en los estudios de asociación genética se aplicó la corrección de Bonferroni ($0.05/\text{número de comparaciones}$) mientras que en el estudio de *microarrays* los valores de p fueron corregidos utilizando el método del FDR.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se describen de manera detallada en cada uno de los estudios que la componen. A continuación se resumen los principales hallazgos de estos estudios.

4.1 Estudio 1. Genética HLA

Rodríguez N, Morer A, González-Navarro EA, Gassó P, Boloc D, Serra-Pagès C, Lafuente A, Lazaro L, Mas S. **Human-leukocyte antigen class II genes in early-onset obsessive-compulsive disorder**. *World J Biol Psychiatry* 2017; 31: 1-7

En nuestra muestra de 143 niños y adolescentes con TOC, se encontraron un total de sesenta y cuatro alelos HLA distintos, treinta y nueve de los cuales (60.9%, 25 en el gen *HLA-DRB1* y 14 en el gen *HLA-DQB1*) presentaban una frecuencia alélica superior al 1%, por lo que se incluyeron en el análisis estadístico. No se identificaron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los pacientes con TOC y las poblaciones de referencia en ninguno de los alelos analizados a nivel individual (tabla 5). Sin embargo, se observó que la frecuencia de los alelos de riesgo del serotipo HLA-DR4 (incluyendo los alelos *04:01*, *04:04* y *04:05*) era significativamente superior en el grupo de casos (10.8%) que en la población de referencia correspondiente (6.8%) ($\chi^2=5.53$, $p=0.018$; OR=1.64, 95% IC 1.08-2.48).

Tabla 5. Frecuencia de los alelos HLA analizados en la muestra de pacientes con TOC y en las poblaciones de referencia.

Gen	Alelo ^a	Pacientes con TOC		Población de referencia		χ^2	p-valor	OR	95% IC
		N	Frecuencia alélica	N	Frecuencia alélica				
<i>DRB1</i>	1:01	20	0.07	107	0.06	0.41	0.518	1.18	0.72-1.93
<i>DRB1</i>	1:02	6	0.02	70	0.04	2.33	0.126	0.52	0.23-1.22
<i>DRB1</i>	1:03	4	0.01	26	0.01	0.30	0.583	0.72	0.22-2.38
<i>DRB1</i>	3:01	35	0.12	226	0.12	0.14	0.705	0.93	0.63-1.36
<i>DRB1</i>	<u>4:01</u>	12	0.04	38	0.02	3.12	0.077	1.84	0.93-3.63
<i>DRB1</i>	4:02	2	0.01	32	0.02	0.82	0.363	0.58	0.18-1.91
<i>DRB1</i>	4:03	5	0.02	38	0.02	0.00	0.969	0.98	0.41-2.35
<i>DRB1</i>	<u>4:04</u>	9	0.03	38	0.02	0.49	0.479	1.32	0.61-2.86
<i>DRB1</i>	<u>4:05</u>	10	0.03	47	0.03	0.67	0.410	1.34	0.67-2.68
<i>DRB1</i>	4:07	0	0	21	0.01	3.40	0.064	0.00	
<i>DRB1</i>	7:01	42	0.15	307	0.16	1.13	0.286	0.83	0.58-1.17
<i>DRB1</i>	8:01	10	0.03	36	0.02	2.46	0.116	1.76	0.86-3.58
<i>DRB1</i>	9:01	2	0.01	13	0.01	0.00	0.955	0.96	0.22-4.27
<i>DRB1</i>	10:01	5	0.02	26	0.01	0.13	0.709	1.20	0.46-3.15
<i>DRB1</i>	11:01	17	0.06	128	0.07	0.58	0.445	0.82	0.48-1.38
<i>DRB1</i>	11:02	6	0.02	32	0.02	0.12	0.724	1.17	0.49-2.83
<i>DRB1</i>	11:03	1	0.01	11	0.01	0.30	0.579	0.56	0.07-4.39
<i>DRB1</i>	11:04	10	0.03	102	0.05	2.38	0.122	0.60	0.31-1.16
<i>DRB1</i>	12:01	5	0.02	19	0.01	0.99	0.317	1.65	0.61-4.46
<i>DRB1</i>	13:01	25	0.09	132	0.07	0.62	0.430	1.20	0.77-1.87
<i>DRB1</i>	13:02	13	0.05	87	0.05	0.06	0.804	0.93	0.51-1.68
<i>DRB1</i>	13:03	4	0.01	32	0.02	0.22	0.633	0.78	0.27-2.21
<i>DRB1</i>	14:01	4	0.01	41	0.02	0.94	0.331	0.60	0.21-1.69
<i>DRB1</i>	15:01	32	0.12	134	0.07	4.48	0.034	1.55	1.03-2.33
<i>DRB1</i>	15:02	2	0.01	23	0.01	0.72	0.395	0.54	0.13-2.30
<i>DRB1</i>	16:01	5	0.02	30	0.02	0.00	0.937	1.04	0.40-2.70
<i>DQB1</i>	2:01	35	0.12	77	0.14	0.22	0.636	0.89	0.54-1.45
<i>DQB1</i>	2:02	40	0.14	99	0.18	1.32	0.251	0.77	0.49-1.21
<i>DQB1</i>	3:01	51	0.18	99	0.18	0.01	0.917	1.02	0.66-1.58
<i>DQB1</i>	3:02	27	0.09	55	0.10	0.01	0.934	0.98	0.56-1.71
<i>DQB1</i>	3:03	6	0.02	8	0.01	0.36	0.545	1.48	0.41-5.30
<i>DQB1</i>	4:02	12	0.04	22	0.04	0.02	0.872	1.07	0.46-2.47
<i>DQB1</i>	5:01	36	0.12	73	0.13	0.01	0.923	0.98	0.60-1.60
<i>DQB1</i>	5:02	5	0.02	6	0.01	0.46	0.495	1.64	0.39-6.94
<i>DQB1</i>	5:03	5	0.02	20	0.04	1.82	0.177	0.48	0.16-1.42
<i>DQB1</i>	6:01	2	0.01	0	0.00	1.96	0.161	0	
<i>DQB1</i>	6:02	30	0.1	53	0.10	0.11	0.737	1.1	0.63-1.90
<i>DQB1</i>	6:03	23	0.08	29	0.05	2.14	0.143	1.66	0.84-3.30
<i>DQB1</i>	6:04	10	0.03	17	0.03	0.19	0.664	1.23	0.48-3.17
<i>DQB1</i>	6:09	4	0.01	4	0.01	0.63	0.426	1.97	0.36-10.85

IC: intervalos de confianza ; OR: *odds ratio*; TOC: trastorno obsesivo-compulsivo

^a Únicamente se muestran los alelos con una frecuencia alélica superior al 1%.

Los alelos subrayados se corresponden con los alelos incluidos en el serotipo HLA-DR4.



The World Journal of Biological Psychiatry



ISSN: 1562-2975 (Print) 1814-1412 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/iwbp20>

Human-leukocyte antigen class II genes in early-onset obsessive-compulsive disorder

Natalia Rodriguez, Astrid Morer, E. Azucena González-Navarro, Patricia Gassó, Daniel Boloc, Carles Serra-Pagès, Amalia Lafuente, Luisa Lazaro & Sergi Mas

To cite this article: Natalia Rodriguez, Astrid Morer, E. Azucena González-Navarro, Patricia Gassó, Daniel Boloc, Carles Serra-Pagès, Amalia Lafuente, Luisa Lazaro & Sergi Mas (2017): Human-leukocyte antigen class II genes in early-onset obsessive-compulsive disorder, *The World Journal of Biological Psychiatry*, DOI: [10.1080/15622975.2017.1327669](https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1327669)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15622975.2017.1327669>



Published online: 31 May 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 68



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iwbp20>

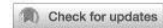
Download by: [UNIVERSITAT DE BARCELONA]

Date: 30 October 2017, At: 11:41



THE WORLD JOURNAL OF BIOLOGICAL PSYCHIATRY, 2017
<https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1327669>

ORIGINAL INVESTIGATION



Human-leukocyte antigen class II genes in early-onset obsessive-compulsive disorder

Natalia Rodríguez^{a,b,c,*}, Astrid Morer^{b,c,d,*}, E. Azucena González-Navarro^{c,e}, Patricia Gassó^{a,c}, Daniel Boloc^a, Carles Serra-Pagès^{c,e,f}, Amalia Lafuente^{a,b,c}, Luisa Lazaro^{b,c,d,g} and Sergi Mas^{a,b,c}

^aDept. Anatomic Pathology, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Barcelona, Spain; ^cInstitut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ^dDepartment of Child and Adolescent Psychiatry and Psychology, Institute of Neurosciences, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain; ^eImmunology Service, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic Dept, Barcelona, Spain; ^fDept. Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ^gPsychiatry and Clinical Psychobiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Objective: The exact aetiology of obsessive-compulsive disorder (OCD) is unknown, although there is evidence to suggest a gene–environment interaction model. Several lines of evidence support a possible role of the immune system in this model.

Methods: The present study explores the allele variability in HLA genes of class II (*HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*) in a sample of 144 early-onset OCD compared with reference samples of general population in the same geographical area.

Results: None of the 39 alleles identified (allele frequency >1%) showed significant differences between OCD and reference populations. Pooling the different alleles that comprised HLA-DR4 (including *DRB1*04:01*, *DRB1*04:04* and *DRB1*04:05* alleles) we observed a significantly higher frequency ($X^2_1 = 5.53$, $P = 0.018$; OR = 1.64, 95% CI 1.08–2.48) of these alleles in the early-onset OCD sample (10.8%) than in the reference population (6.8%).

Conclusions: Taking into account the role of HLA class II genes in the central nervous system, the results presented here support a role of the immune system in the pathophysiological model of OCD.

ARTICLE HISTORY

Received 16 December 2016
 Revised 28 March 2017
 Accepted 2 May 2017

KEYWORDS

Early-onset obsessive-compulsive disorder; human-leukocyte antigen; genetics; immune system; allelic variants

Introduction

Obsessive-compulsive disorder (OCD) is a neuropsychiatric disease characterised by different combinations of obsessions and/or compulsions that are distressing, time-consuming or significantly impairing. It is the fourth most common psychiatric illness, with a lifetime prevalence of 1–3% (Ruscio et al. 2010). The exact aetiology of OCD is unknown, although there is evidence to suggest a model in which OCD-related genes confer susceptibility to the disease in the presence of certain environmental factors (Pauls et al. 2014). Several family and twin studies have provided evidence for heritability of OCD. As with other complex neuropsychiatric disorders, OCD susceptibility seems to be determined by the sum of a large number of genes with modest effect (Stewart et al. 2013; Taylor 2013; Mattheisen et al. 2015). A recent whole-exome sequencing study

in OCD identified a higher rate of rare de novo single nucleotide variants in immunological pathways (Cappi et al. 2016).

In recent years, several authors reported an increased frequency of OCD symptoms in children and adolescents with Sydenham's chorea (SC), a neurological complication of group A β -haemolytic streptococcal (GABHS) pharyngitis, and one of the main criteria for the diagnosis of acute rheumatic fever (RF), an inflammatory autoimmune disease (Swedo et al. 1989). The basal ganglia have been implicated as a target of the post-streptococcal autoimmune mechanism involved in SC (Teixeira et al. 2014). The presence of psychiatric disorders in patients with a previous history of RF suggest that GABHS may trigger OCD and related disorders that may persist even in the absence of GABHS reinfections. Other causes of infectious disease possibly related to OCD include *Toxoplasma gondii*, a parasite that has

CONTACT Sergi Mas sergimash@ub.edu Dept. Anatomic Pathology, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, IDIBAPS, Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain; Luisa Lazaro LLAZARO@clinic.cat Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychology, Institute of Neurosciences, Hospital Clinic de Barcelona, C/Villarroel 170, E-08036 Barcelona, Spain

*Both authors contributed equally to this work.

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

strong tropism to the central nervous system, especially basal ganglia (Fabiani et al. 2013); and Borna disease virus, an RNA virus that determines neurological syndromes in higher vertebrates and has been suggested to enhance glutamate levels, leading to thalamocortical dysfunction (Rotge et al. 2010).

Based on these associations, several studies have assessed immune parameters and genes in OCD (Teixeira et al. 2014). Recently, an exon-focused genome-wide association study identified, as top signals, two genetic polymorphisms in the major histocompatibility complex (MHC) locus (Costas et al. 2016). The MHC system comprises closely linked genes controlling highly polymorphic proteins involved in the presentation of peptides to the T cell receptor. The highly variable, classical human-leukocyte antigen (HLA), classified as genes of class I (*HLA-A*, *HLA-C*, *HLA-B*) and of class II (*HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*) (Walsh et al. 2003) can be used to characterise the variability in the MHC region. The combination of different HLA alleles may define susceptibility to certain infectious diseases. HLA alleles of the class II genes, including *HLA-DRB1* and *HLA-DQB1*, have been associated with more than 100 different diseases, including classical autoimmune diseases (AIDs) such as diabetes mellitus, rheumatoid arthritis (RA), multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus (Miyadera & Tokunaga 2015).

Genetic associations involving this region have been reported for several neuropsychiatric disorders, mainly schizophrenia (Mokhtari & Lachman 2016) and autism (Needleman & McAllister 2012).

Although many schizophrenia genetic association studies have been conducted in different populations using several HLA alleles (Kodavali et al. 2014), results were not consistently replicated. Independent Genome Wide Association studies (GWAS) with European populations identified several common variants within the MHC locus strongly associated with the risk of schizophrenia (International Schizophrenia Consortium 2009; Shi et al. 2009; Stefansson et al. 2009). Subsequent GWAS on other ethnic populations consistently replicated these associations (Ikeda et al. 2011; Yue et al. 2011). However, the high linkage disequilibrium in the MHC region makes it difficult to identify the disease-associated variants. Nevertheless, the consistent replication in diverse populations and meta-analyses has caused the HLA locus association to be considered the most significant and consistent finding in schizophrenia (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014).

Regarding autism, Warren et al. (1996) were the first to present data suggesting that the shared epitope of

HLA-DR4 alleles is a common genetic variant, with a 31.5% increase of autism over control subjects. Similar results of higher frequencies of the DR4 allele in three autism populations over controls replicated this association (Torres et al. 2002; Lee et al. 2006; Chien et al. 2012). A maternal-foetal immune interaction for HLA-DR4 has been suggested as boys with autism and their mothers were shown to have an increased DR4 frequency over control subjects (Lee et al. 2006), and significant transmission disequilibrium for DR4 was reported from maternal grandparents to mothers of children with autism (Johnson et al. 2009).

Considering the proposed link between OCD and autoimmunity (Swedo et al. 1989) and the important role that HLA alleles play in autoimmune diseases, the present study undertakes an extensive exploration of the allele variability in HLA genes of class II (*HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*) in a sample of 144 early-onset OCD compared with reference samples of general population in the same geographical area.

Material and methods

Early-onset OCD sample

A total of 144 patients meeting DSM-IV (American Psychiatric Association 1994) diagnostic criteria for OCD were recruited from the Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychology at the Hospital Clínic in Barcelona (Mas et al. 2013, 2014, 2016). Ethnicity was determined by self-reported ancestries; cases reported the ethnicity of each grandparent. Subjects who mentioned non-European grandparents were considered as non-Caucasian and were excluded. Patients were interviewed with the Spanish version (Ulloa et al. 2006) of the semi-structured diagnostic interview K-SADS-PL (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version) (Kaufman et al. 1997) in order to assess current and past psychopathology.

All procedures were approved by the hospital's Ethics Committee. Written informed consent was obtained from all parents, and verbal informed consent was given by all subjects following an explanation of the procedures involved.

Reference population sample

Two independent populations of the same geographical area were selected from The Allele Frequency Net Database (<http://www.allelefrequencies.net/>) as reference population samples. A sample of 941 randomly selected individuals from the Umbilical Cord Blood

Bank of Barcelona (Vidal et al. 2002) from Barcelona were used as reference for the DRB1 alleles. A sample of 280 healthy volunteer blood donors from Granada was used as reference for the DQB1 alleles (Pascual et al. 2001).

Sample preparation

Blood samples were collected from the individuals in EDTA (K2EDTA BD Vacutainer EDTA tubes; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), and genomic DNA was extracted with the MagNA Pure LC DNA isolation Kit III and an LC MagNA Pure system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The DNA concentration was determined by absorbance (ND1000, NanoDrop, Wilmington, DE).

HLA allele typing

HLA typing of loci *DRB1* and *DQB1* of OCD patients was obtained using sequence-specific oligonucleotide (SSO) probes on a Luminex platform (Luminex, USA) using LIFECODES HLA- SSO typing kits (Immucor, Stamford, CT, USA). The HLA alleles were assigned by using the MatchIT DNA programme (Immucor).

Statistics

HLA allele frequencies were assessed using the 'genetics' R package, and for each allele with an allele frequency >0.01 the chi-square test and 'odds ratio' with 95% confidence intervals were computed to assess differences between OCD patients and the reference population. To account for the multiple testing issue, we applied a Bonferroni correction (0.05/number of analysed alleles).

Results

Sixty-four different HLA alleles were identified. Thirty-nine of those alleles (60.9%, 25 in the *HLA-DRB1* gene and 14 in the *HLA-DQB1* gene) were found in an allelic frequency >0.01 and were included in the statistical analysis. The statistical significance was corrected using Bonferroni correction and the *P* value threshold for significance was set at 0.001.

Table 1 displays the frequency of each allele analysed in both the early-onset OCD patients and the reference population and the results of the statistical analysis showing the chi-square test and the computed odds ratio. As can be seen, none of the 39 alleles identified showed significant differences between OCD and reference populations.

Among the different HLA alleles of the class II genes, those in the serological type HLA-DR4 (including *04:01*, *04:04* and *04:05* alleles) have been the most consistently associated with RA and type 1 diabetes (T1D) in Caucasian populations. Pooling the different alleles that comprised the HLA-DR4 serotype we observed a significantly higher frequency ($X^2_1=5.53$, $P=0.018$; OR =1.64, 95% CI 1.08–2.48) of these alleles in the early-onset OCD sample (10.8%) than in the reference population (6.8%).

Discussion

To our knowledge, the present study is the first to undertake a HLA typing of MCH Class II genes, including *HLA-DRB1* and *HLA-DQB1*, in order to assess their association with early-onset OCD. We observed a significant enrichment of *HLA-DRB1*04* alleles defining the HLA-DR4 serotype in the OCD sample in comparison with reference sample.

Strong, confirmed associations of HLA-DR4 with the risk of autoimmune diseases such as RA and T1D have been reported by numerous studies (Miyadera & Tokunaga 2015). In Caucasian populations, alleles *HLA-DRB1*04:01* and *04:04* are responsible for the stronger associations reported for RA. These alleles carry a shared epitope at amino acid positions 70 β to 74 β , which may be responsible for the mechanism of action underlying the association between HLA-DRB1 and autoimmune diseases (Raychaudhuri et al. 2012). Two models have been proposed to explain these associations (Miyadera & Tokunaga 2015). In the peptide-specific model, the associations of HLA with autoimmune diseases may be explained by the selective presentation of disease-relevant self-peptides by the disease-susceptible HLA allele products. In contrast, the HLA stability model proposes that intrinsically unstable HLA proteins (susceptibility alleles), which form unstable HLA-peptide complexes through the presentation of diverse self-peptides, increase the risk of autoimmune diseases.

In the central nervous system, expression of MHC class II genes has traditionally been restricted to microglial cells. However, a recent study identified a subpopulation of human neural stem cells which express MHC class II molecules during development (Vagaska et al. 2016). Given the proposed crosstalk between neurons and microglia in the normal brain, transient MHC-II expression in embryonic neurons may play a role in microglial development (Eyo & Wu 2013). A specific role for microglia in the pathophysiology of OCD has been suggested by a recent mouse model of OCD symptomatology (Greer & Capecci 2002).

Table 1. Frequency of each allele analysed (allele frequency >0.01) in both the early-onset OCD patients and the reference populations (Barcelona Reference Sample for DRB1, $N=941$; Granada Reference Sample for DQB1, $N=280$), and the results of the statistical analysis showing the chi-square test and the computed odds ratio (OR). Only alleles with frequency >0.01 are shown. In italics, alleles used to create the HLA-DR4 serotype.

Gene	Allele	Early-onset OCD		Reference population		Statistic	P value	OR	95% CI
		N	Allele frequency	N	Allele frequency				
DRB1	1:01	20	0.07	107	0.06	0.41	0.518	1.18	0.72–1.93
DRB1	1:02	6	0.02	70	0.04	2.33	0.126	0.52	0.23–1.22
DRB1	1:03	4	0.01	26	0.01	0.30	0.583	0.72	0.22–2.38
DRB1	3:01	35	0.12	226	0.12	0.14	0.705	0.93	0.63–1.36
<i>DRB1</i>	<i>4:01</i>	<i>12</i>	<i>0.04</i>	<i>38</i>	<i>0.02</i>	<i>3.12</i>	<i>0.077</i>	<i>1.84</i>	<i>0.93–3.63</i>
DRB1	4:02	2	0.01	32	0.02	0.82	0.363	0.58	0.18–1.91
DRB1	4:03	5	0.02	38	0.02	0.00	0.969	0.98	0.41–2.35
<i>DRB1</i>	<i>4:04</i>	<i>9</i>	<i>0.03</i>	<i>38</i>	<i>0.02</i>	<i>0.49</i>	<i>0.479</i>	<i>1.32</i>	<i>0.61–2.86</i>
<i>DRB1</i>	<i>4:05</i>	<i>10</i>	<i>0.03</i>	<i>47</i>	<i>0.03</i>	<i>0.67</i>	<i>0.410</i>	<i>1.34</i>	<i>0.67–2.68</i>
DRB2	4:07	0	0	21	0.01	3.40	0.064	0.00	
DRB1	7:01	42	0.15	307	0.16	1.13	0.286	0.83	0.58–1.17
DRB1	8:01	10	0.03	36	0.02	2.46	0.116	1.76	0.86–3.58
DRB1	9:01	2	0.01	13	0.01	0.00	0.955	0.96	0.22–4.27
DRB1	10:01	5	0.02	26	0.01	0.13	0.709	1.20	0.46–3.15
DRB1	11:01	17	0.06	128	0.07	0.58	0.445	0.82	0.48–1.38
DRB1	11:02	6	0.02	32	0.02	0.12	0.724	1.17	0.49–2.83
DRB1	11:03	1	0.01	11	0.01	0.30	0.579	0.56	0.07–4.39
DRB1	11:04	10	0.03	102	0.05	2.38	0.122	0.60	0.31–1.16
DRB1	12:01	5	0.02	19	0.01	0.99	0.317	1.65	0.61–4.46
DRB1	13:01	25	0.09	132	0.07	0.62	0.430	1.20	0.77–1.87
DRB1	13:02	13	0.05	87	0.05	0.06	0.804	0.93	0.51–1.68
DRB1	13:03	4	0.01	32	0.02	0.22	0.633	0.78	0.27–2.21
DRB1	14:01	4	0.01	41	0.02	0.94	0.331	0.60	0.21–1.69
DRB1	15:01	32	0.12	134	0.07	4.48	0.034	1.55	1.03–2.33
DRB1	15:02	2	0.01	23	0.01	0.72	0.395	0.54	0.13–2.30
DRB1	16:01	5	0.02	30	0.02	0.00	0.937	1.04	0.40–2.70
DQB1	2:01	35	0.12	77	0.14	0.22	0.636	0.89	0.54–1.45
DQB1	2:02	40	0.14	99	0.18	1.32	0.251	0.77	0.49–1.21
DQB1	3:01	51	0.18	99	0.18	0.01	0.917	1.02	0.66–1.58
DQB1	3:02	27	0.09	55	0.10	0.01	0.934	0.98	0.56–1.71
DQB1	3:03	6	0.02	8	0.01	0.36	0.545	1.48	0.41–5.30
DQB1	4:02	12	0.04	22	0.04	0.02	0.872	1.07	0.46–2.47
DQB1	5:01	36	0.12	73	0.13	0.01	0.923	0.98	0.60–1.60
DQB1	5:02	5	0.02	6	0.01	0.46	0.495	1.64	0.39–6.94
DQB1	5:03	5	0.02	20	0.04	1.82	0.177	0.48	0.16–1.42
DQB1	6:01	2	0.01	0	0.00	1.96	0.161	0	
DQB1	6:02	30	0.1	53	0.10	0.11	0.737	1.1	0.63–1.90
DQB1	6:03	23	0.08	29	0.05	2.14	0.143	1.66	0.84–3.30
DQB1	6:04	10	0.03	17	0.03	0.19	0.664	1.23	0.48–3.17
DQB1	6:09	4	0.01	4	0.01	0.63	0.426	1.97	0.36–10.85

Mice with disruptions of the HoxB8 gene, a homeobox developmental patterning gene expressed prominently in macrophage-lineage haematopoietic cells, were observed to exhibit excessive grooming behaviour. More recently, mutations in the Hoxb8 gene in the microglia have been found to be necessary and sufficient for developing this phenotype. Transplantation of wild-type bone marrow into mutant Hoxb8 mice reversed this phenotype by allowing repopulation of the brain with wild-type microglia. Conversely, transplant of Hoxb8 mutant bone marrow into wild-type mice can induce pathological grooming behaviour (Chen et al. 2010). The mechanisms of this effect remain unclear. In the brain, a subset of microglia (although not all) express Hoxb8. The specific physiological role of this particular subset of Hoxb8+ microglia has yet to be described. The few

post-mortem studies in OCD performed to date have not investigated microglial activation.

Other evidence of the involvement of DR4 in neuropsychiatric diseases comes from related disorders such as autism spectrum disorders (ASD). Warren et al. (1996) first reported that the HLA ancestral haplotype 44.1 (B44-SC30-DR4) was associated with autism with a relative risk of 7.9. That result was confirmed in independent case-control studies (Torres et al. 2002; Chien et al. 2012). Lee et al. (2006) found that boys with autism and their mothers had a significantly higher frequency of DR4 than normal control subjects, suggesting that a maternal-foetal immune interaction could be involved in autism. Johnson et al. (2009) reported a significant transmission disequilibrium for HLA-DR4 (odds ratio 4.67) from maternal grandparents to mothers of children with autism, which also

suggests a maternal–foetal interaction for HLA-DR4 (Johnson et al. 2009). It has recently been shown in Han Chinese that the HLA-DR β 1 allele frequencies including DR4 are different in subjects with autism versus control subjects (Chien et al. 2012). It is known that there is an overlap between behaviours seen in children with OCD and the ritualized/repetitive behaviours commonly observed in children with ASD, who may perform behaviours such as ordering, arranging, counting, or touching/tapping that are difficult to differentiate from real obsessions and compulsions, especially when patients have limited insight. Similar abnormalities have been reported in animal models that reproduce aspects of the pathophysiology or symptomatology of autism. For instance, BTBR T+tf/J mice, which exhibit reduced social interaction and a restricted behavioural repertoire (some of the core symptoms of autism), have increased MHC2-expressing microglia compared with control mice (Heo et al. 2011). Transplantation of mesenchymal stem cells in BTBR T+tf/J mice resulted in a reduction of stereotypical behaviours, a decrease in cognitive rigidity and an improvement in social behaviour (Segal-Gavish et al. 2016).

The findings of this study should be interpreted in the context of several important limitations. The sample size limits its statistical power and makes it difficult to detect small or modest effects of common alleles. Given that the study was hypothesis driven, and due to the small sample size, our results should be seen as preliminary and should be considered as exploratory findings in need of further confirmation. However, it should be noted that our sample comprised early-onset OCD patients, and so the sample represented a homogeneous clinical population.

In conclusion, and taking into account the study's limitations, we identified a higher frequency of HLA-DRB1*04 alleles consistently associated with a higher risk of autoimmune diseases in a sample of early-onset OCD patients in comparison with a population group. Further replications in larger cohorts are needed to confirm the clinical applicability of our data. The results presented here support a role of the immune system in the aetiology of OCD, and could suggest a possible involvement of microglial dysregulation in the pathophysiological model of OCD.

Acknowledgements

This research was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad (PI13/01767) and Fundación Alicia Koplowitz. Support was also given by the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i Recerca (AGAUR) of the Generalitat de

Catalunya to the Child Psychiatry and Psychology Group (2014 SGR 489) and to the Clinical Pharmacology and Pharmacogenetics Group (2014 SGR 436). The funding sources played no role in the study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the paper for publication.

Statement of interest

None to declare.

Funding

This research was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad [PI13/01767] and Fundación Alicia Koplowitz. Support was also given by the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i Recerca (AGAUR) of the Generalitat de Catalunya to the Child Psychiatry and Psychology Group [2014 SGR 489] and to the Clinical Pharmacology and Pharmacogenetics Group [2014 SGR 436]. The funding sources played no role in the study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the paper for publication.

References

- American Psychiatric Association. 1994. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th ed. Washington (DC): American Psychiatric Press.
- Cappi C, Brentani H, Lima L, Sanders SJ, Zai G, Diniz BJ, Reis VN, Hounie AG, Conceição do Rosário M, Mariani D, et al. 2016. Whole-exome sequencing in obsessive-compulsive disorder identifies rare mutations in immunological and neurodevelopmental pathways. *Transl Psychiatry*. 29:e764.
- Chen SK, Tvrdik P, Peden E, Cho S, Wu S, Spangrude G, Capecchi MR. 2010. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell*. 141:775–785.
- Chien YL, Wu YY, Chen CH, Gau SS, Huang YS, Chien WH, Hu FC, Chao YL. 2012. Association of HLA-DRB1 alleles and neuropsychological function in autism. *Psychiatr Genet*. 22:46–49.
- Costas J, Carrera N, Alonso P, Gurriarán X, Segalàs C, Real E, López-Solà C, Mas S, Gassó P, Domènech L, et al. 2016. Exon-focused genome-wide association study of obsessive-compulsive disorder and shared polygenic risk with schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 29:e768.
- Eyo UB, Wu LJ. 2013. Bidirectional microglia–neuron communication in the healthy brain. *Neural Plast*. 13:456857.
- Fabiani S, Pinto B, Bruschi F. 2013. Toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases: can serological studies establish a clear relationship? *Neurol Sci*. 34:417–425.
- Greer JM, Capecchi MR. 2002. Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron*. 33:23–34.
- Heo Y, Zhang Y, Gao D, Miller VM, Lawrence DA. 2011. Aberrant immune responses in a mouse with behavioral disorders. *PLoS One*. 6:e20912.
- Ikeda M, Aleksic B, Kinoshita Y, Okochi T, Kawashima K, Kushima I, Ito Y, Nakamura Y, Kishi T, Okumura T, et al. 2011. Genome-wide association study of schizophrenia in a Japanese population. *Biol Psychiatry*. 69:472–478.

- International Schizophrenia Consortium, Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, Sullivan PF, Sklar P. 2009. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*. 460:748–752.
- Johnson WG, Buyske S, Mars AE, Sreenath M, Stenroos ES, Williams TA, Stein R, Lambert GH. 2009. HLA-DR4 as a risk allele for autism acting in mothers of probands possibly during pregnancy. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 163:542–546.
- Kaufman J, Birmaher B, Brent D, Rao U, Flynn C, Moreci P, Williamson D, Ryan N. 1997. Schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children-present and lifetime version (K-SADS-PL): initial reliability and validity data. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 36:980–988.
- Kodavali CV, Watson AM, Prasad KM, Celik C, Mansour H, Yolken RH, Nimgaonkar VL. 2014. HLA associations in schizophrenia: are we re-discovering the wheel? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 165B:19–27.
- Lee LC, Zachary AA, Leffell MS, Newschaffer CJ, Matteson KJ, Tyler JD, Zimmerman AW. 2006. HLA-DR4 in families with autism. *Pediatr Neurol*. 35:303–307.
- Mas S, Gassó P, Morer A, Calvo A, Bargalló N, Lafuente A, Lázaro L. 2016. Integrating genetic, neuropsychological and neuroimaging data to model early-onset obsessive compulsive disorder severity. *PLoS One*. 11:e0153846.
- Mas S, Pagerols M, Gassó P, Ortiz A, Rodriguez N, Morer A, Plana MT, Lafuente A, Lázaro L. 2014. Role of GAD2 and HTR1B genes in early-onset obsessive-compulsive disorder: results from transmission disequilibrium study. *Genes Brain Behav*. 13:409–417.
- Mas S, Plana MT, Castro-Fornieles F, Gassó P, Lafuente A, Moreno E, Martínez E, Milà M, Lázaro L. 2013. Common genetic background in anorexia nervosa and obsessive compulsive disorder: preliminary results from an association study. *J Psychiatr Res*. 47:747–754.
- Mattheisen M, Samuels JF, Wang Y, Greenberg BD, Fyer AJ, McCracken JT, Geller DA, Murphy DL, Knowles JA, Grados MA, et al. 2015. Genome-wide association study in obsessive-compulsive disorder: results from the OCGAS. *Mol Psychiatry*. 20:337–344.
- Miyadera H, Tokunaga K. 2015. Associations of human leukocyte antigens with autoimmune diseases: challenges in identifying the mechanism. *J Hum Genet*. 60:697–702.
- Mokhtari R, Lachman HM. 2016. The Major Histocompatibility Complex (MHC) in Schizophrenia: A Review. *J Clin Cell Immunol*. 7:479.
- Needleman LA, McAllister AK. 2012. The major histocompatibility complex and autism spectrum disorder. *Dev Neurobiol*. 72:1288–1301.
- Pascual M, Nieto A, López-Nevot MA, Ramal L, Matarán L, Caballero A, Alonso A, Martín J, Zanelli E. 2001. Rheumatoid arthritis in southern Spain: toward elucidation of a unifying role of the HLA class II region in disease predisposition. *Arthritis Rheum*. 44:307–314.
- Pauls DL, Abramovitch A, Rauch SL, Geller DA. 2014. Obsessive-compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. *Nat Rev Neurosci*. 15:410–424.
- Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, Alfredsson L, Padyukov L, Klareskog L, Worthington J, et al. 2012. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 44:291–296.
- Rotge JY, Aouizerate B, Tignol J, Bioulac B, Burbaud P, Guehl D. 2010. The glutamate-based genetic immune hypothesis in obsessive-compulsive disorder. An integrative approach from genes to symptoms. *Neuroscience*. 20:408–417.
- Ruscio AM, Stein DJ, Chiu WT, Kessler RC. 2010. The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Mol Psychiatry*. 15:53–63.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. 2014. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. 511:421–427.
- Segal-Gavish H, Karvat G, Barak N, Barzilay R, Ganz J, Edry L, Aharoni I, Offen D, Kimchi T. 2016. Mesenchymal stem cell transplantation promotes neurogenesis and ameliorates autism related behaviors in BTBR mice. *Autism Res*. 9:17–32.
- Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe'er I, Dudbridge F, Holmans PA, Whittemore AS, Mowry BJ, et al. 2009. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature*. 460:753–757.
- Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, Werge T, Pietiläinen OP, Mors O, Mortensen PB, et al. 2009. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*. 460:744–747.
- Stewart SE, Yu D, Scharf JM, Neale BM, Fagerness JA, Mathews CA, Arnold PD, Evans PD, Gamazon ER, Davis LK, et al. 2013. Genome-wide association study of obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry*. 18:788–798.
- Swedo SE, Rapoport JL, Cheslow DL, Leonard HL, Ayoub EM, Hosier DM, Wald ER. 1989. High prevalence of obsessive-compulsive symptoms in patients with Sydenham's chorea. *Am J Psychiatry*. 146:246–249.
- Taylor S. 2013. Molecular genetics of obsessive-compulsive disorder: a comprehensive meta-analysis of genetic association studies. *Mol Psychiatry*. 18:799–805.
- Teixeira AL, Rodrigues DH, Marques AH, Miguel EC, Fontenelle LF. 2014. Searching for the immune basis of obsessive-compulsive disorder. *Neuroimmunomodulation*. 21:152–158.
- Torres AR, Maciulis A, Stubbs EG, Cutler A, Odell D. 2002. The transmission disequilibrium test suggests that HLA-DR4 and DR13 are linked to autism spectrum disorder. *Hum Immunol*. 63:311–316.
- Ulloa RE, Ortiz S, Higuera F, Nogales I, Fresán A, Apiquian R, Cortés J, Arechavaleta B, Foullieux C, Martínez P, et al. 2006. Interrater reliability of the Spanish version of Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children–Present and Lifetime version (K-SADS-PL). *Actas Esp Psiquiatr*. 34:36–40.
- Vagaska B, New SE, Alvarez-Gonzalez C, D'Acquisto F, Gomez SG, Bulstrode NW, Madrigal A, Ferretti P. 2016. MHC-class-II are expressed in a subpopulation of human neural stem cells in vitro in an IFN γ -independent fashion and during development. *Sci Rep*. 6:24251.
- Vidal S, Morante MP, Moga E, Mosquera AM, Querol S, Garcia J, Rodríguez-Sánchez J. 2002. Molecular analysis of HLA-DRB1 polymorphism in north-east Spain. *Eur J Immunogenet*. 29:75–77.

Walsh EC, Mather KA, Schaffner SF, Farwell L, Daly MJ, Patterson N, Cullen M, Carrington M, Bugawan TL, Erlich H, et al. 2003. An integrated haplotype map of the human major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet.* 73:580–590.

Warren RP, Odell JD, Warren WL, Burger RA, Maciulis A, Daniels WW, Torres AR. 1996. Strong association of the

third hypervariable region of HLA-DR beta 1 with autism. *J Neuroimmunol.* 67:97–102.

Yue WH, Wang HF, Sun LD, Tang FL, Liu ZH, Zhang HX, Li WQ, Zhang YL, Zhang Y, Ma CC, et al. 2011. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for schizophrenia in Han Chinese at 11p11.2. *Nat Genet.* 43:1228–1231.

4.2 Estudio 2. Caracterización de monocitos

Rodríguez N, Morer A, González-Navarro EA, Serra-Pages C, Boloc D, Torres T, García-Cerro S, Mas S, Gassó P, Lázaro L. **Inflammatory dysregulation of monocytes in pediatric patients with obsessive-compulsive disorder.** *Journal of Neuroinflammation* 2017; 14:261

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron la existencia de una elevada correlación entre los distintos niveles de citoquinas analizadas (IL-1 β , IL-6, GM-CSF, TNF- α e IL-8), tanto en condiciones basales como después del tratamiento de los monocitos cultivados con LPS o con LPS+DEX. Asimismo, la producción de citoquinas se correlacionó significativamente con el porcentaje de monocitos totales.

El análisis de los niveles de monocitos mostró que los individuos con TOC presentaban un porcentaje de monocitos totales significativamente superior a los controles sanos ($F=7.199$, $p=0.008$). En cuanto a la distribución de las distintas subpoblaciones celulares, se observó que los niveles de monocitos CD16+ (monocitos intermedios + no clásicos) eran mayores en el grupo de pacientes que en el de controles ($F=18.188$, $p=0.00004$). Estas diferencias se debieron, principalmente, a la duplicación en el porcentaje de monocitos intermedios en los pacientes con TOC ($F=15.013$, $p=0.0002$), aunque también se observó un ligero incremento en la proporción de monocitos no clásicos en estos pacientes ($F=7.107$, $p=0.009$). Al mismo tiempo, los niveles de monocitos clásicos fueron ligeramente inferiores en los individuos con TOC que en los sujetos control ($F=10.188$, $p=0.002$). Estos resultados pueden verse representados en la figura 6.

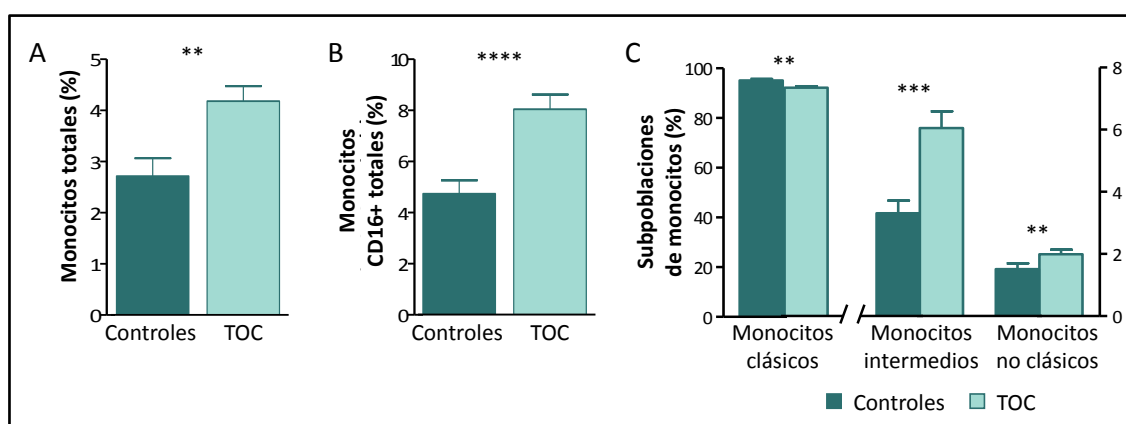


Figura 6. Porcentaje de monocitos totales (A) y distribución de las poblaciones de monocitos CD16+ (B), monocitos clásicos, intermedios y no clásicos (C) en niños y adolescentes con TOC y en los individuos control. Los resultados se expresan como media \pm SEM. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$

Por lo que respecta a los niveles de citoquinas, no se encontraron diferencias entre casos y controles en las muestras de monocitos no tratadas. En cambio, tras la estimulación de los cultivos celulares primarios con LPS, se observó que la producción de las cinco citoquinas proinflamatorias evaluadas era significativamente más elevada en los pacientes con TOC que en los individuos control (IL-1 β : F=8.216 p=0.005; IL-6: F=8.570 p=0.004; GM-CSF: F=4.433 p=0.049; TNF- α : F=4.241 p=0.041; IL-8: F=6.330 p=0.013). Este efecto diferencial del LPS sobre la producción de citoquinas se observó de nuevo tras el tratamiento de los monocitos con LPS+DEX, de modo que los pacientes con TOC continuaron liberando niveles más elevados de citoquinas proinflamatorias que los individuos control. Estas diferencias fueron significativas para algunas de las citoquinas (IL-1 β : F=5.528 p=0.020; IL-6: F=6.284 p=0.014; IL-8: F=10.326 p=0.002). No obstante, no se observaron diferencias entre casos y controles en la sensibilidad de los monocitos a la dexametasona, expresada como el porcentaje de reducción en los niveles de citoquinas en los monocitos tratados con LPS+DEX respecto a las células estimuladas únicamente con LPS. En la figura 7 puede verse representado el efecto de los distintos tratamientos sobre la producción de citoquinas en los monocitos cultivados de pacientes con TOC de inicio temprano y de individuos control.

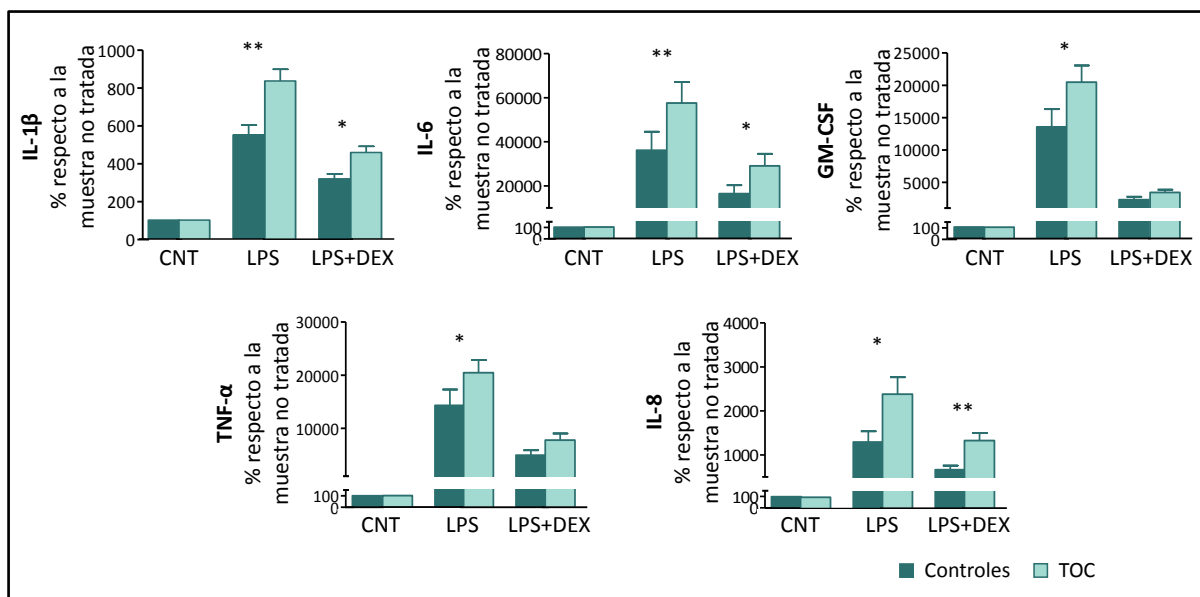


Figura 7. Citoquinas secretadas por los monocitos en condiciones basales (CNT) y tras el tratamiento con lipopolisacárido (LPS) o LPS y dexametasona (LPS+DEX) en pacientes con TOC e individuos control. Los resultados se expresan como media \pm SEM. *p<0.05; **p<0.01

Por otro lado, se evaluó la posible relación entre los parámetros inflamatorios asociados con el TOC y determinadas características clínicas de estos pacientes. Estas comparaciones mostraron un

posible efecto del tratamiento farmacológico sobre la distribución de las distintas poblaciones de monocitos y los niveles de producción de citoquinas tras el tratamiento con LPS. Así, los individuos con unos niveles más elevados de monocitos CD16+ (intermedios + no clásicos), de monocitos intermedios y de monocitos no clásicos fueron los pacientes no tratados, seguidos de los pacientes tratados y finalmente los controles sanos (monocitos CD16+: $F=10.372$ $p=0.00007$; monocitos intermedios: $F=8.647$ $p=0.0003$; monocitos no clásicos: $F=3.561$ $p=0.032$) (figura 8A-B). Por el contrario, la tendencia observada en los monocitos clásicos presentó la dirección inversa ($F=6.620$ $p=0.002$) (figura 8B). El tratamiento farmacológico mostró el mismo efecto sobre los niveles de citoquinas tras la estimulación con LPS, de modo que los individuos con unos niveles más altos fueron nuevamente los pacientes no tratados, seguidos de los pacientes tratados y, por último, los controles (IL-1 β : $F=5.464$ $p=0.005$; IL-6: $F=5.076$ $p=0.008$; GM-CSF: $F=1.917$ $p=0.151$; TNF- α : $F=2.102$ $p=0.126$; IL-8: $F=4.526$ $p=0.013$) (figura 8C). Los análisis post-hoc revelaron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes respecto a los individuos control ($p<0.05$) pero no alcanzaron la significación al comparar los sujetos con TOC que recibían tratamiento farmacológico y los que no.

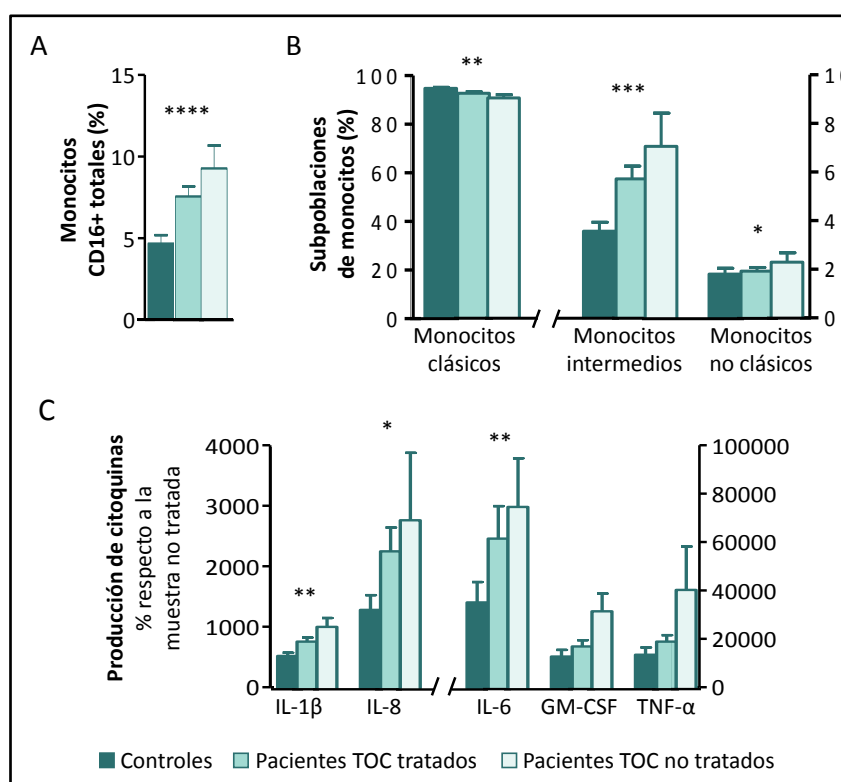


Figura 8. Influencia del tratamiento farmacológico en las subpoblación de monocitos CD16+ (A), monocitos clásicos, intermedios y no clásicos (B) y en la producción de citoquinas tras la estimulación de los monocitos con lipopolisacárido (C) en pacientes con TOC. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$.

En relación con el resto de las características clínicas de los pacientes con TOC evaluadas, no se identificó ninguna asociación significativa entre los niveles de monocitos y la producción de citoquinas ni con la severidad de la sintomatología ni con el tiempo de evolución del trastorno.

En cuanto al análisis de los perfiles de expresión génica (resultados pendientes de ser publicados) se llevó a cabo únicamente en las muestras de monocitos no tratados y tras la estimulación con LPS, dado que en el *estudio 2* no se habían encontrado diferencias en la sensibilidad de los monocitos a la dexametasona entre el grupo de pacientes y el de controles. Los resultados obtenidos mostraron que en condiciones basales 258 genes presentaban unos niveles de expresión significativamente distintos [valor de p corregido inferior a 0.01 y $\log(\text{foldchange})$ superior o igual a 2] entre casos y controles (anexo 1). Entre los 10 genes con unas diferencias de expresión más significativas se encontraron diversos genes de la región HLA (*HLA-DRA*, *HLA-DRB3* y *HLA-DMA*) y otros relacionados con la presentación de antígenos y el sistema inmunitario (*IFI30* y *CAPNS1*). Por otro lado, al analizar los niveles de expresión génica de los monocitos tras la estimulación con LPS, se identificaron 139 genes con diferencias de expresión significativas entre los pacientes con TOC y los sujetos control (anexo 2). Entre los 10 genes que mostraron unas diferencias de expresión más significativas se encontraron varios que codifican para citoquinas y quimioquinas (*CCL3L1*, *CCL22*, *CCL3* e *IL1B*) y para otras moléculas implicadas en la respuesta inmunitaria (*IDO1*). Cabe destacar que el gen que presentó unas diferencias de expresión más pronunciadas codifica para la IL-1 β . Además, tras comparar el listado de genes diferencialmente expresados en condiciones basales y tras la estimulación con LPS se identificaron un total de 64 genes exclusivos de la activación con LPS (anexo 3). En este caso, se observó de nuevo que los genes con unas diferencias de expresión más significativas codifican para distintas citoquinas y quimiocinas (*CCL20*, *CCL22*, *CCL3* y *CCL3L1*) y otras proteínas implicadas en la regulación de la respuesta inmunitaria (*ADA*, *AQP9*).

Con el fin de evaluar el grado de conectividad existente entre los 258, los 139 y los 64 genes diferencialmente expresados entre casos y controles, se construyeron tres redes de interacción proteica utilizando la base de datos STRING. Las redes generadas incluyeron más del 97% de los genes diferencialmente expresados sin necesidad de incluir genes externos, mostrando así una elevada conectividad entre ellos (anexo 4).

Por otro lado, para proporcionar una interpretación funcional de estos resultados, se identificaron qué procesos biológicos estaban enriquecidos en los tres listados de genes diferencialmente expresados. Este análisis funcional permitió identificar un total de 19 módulos funcionales (valor de enriquecimiento superior a 2 y tres o más procesos biológicos con un valor de p corregido por el

método del FDR inferior a 0.05) en condiciones basales, 18 tras la estimulación con LPS y 7 a partir del listado de genes diferencialmente expresados exclusivamente tras la activación con LPS. La mayoría de estos módulos se encontraban relacionados con la función inmunitaria (anexos 5, 6 y 7). En condiciones basales, los módulos funcionales más significativos incluían distintos procesos biológicos relacionados con el procesamiento y la presentación de antígenos. Además, pudieron observarse otros procesos relacionados con la respuesta a estímulos químicos y orgánicos (módulos 4, 10, 14 y 15), la regulación del sistema inmunitario y de la respuesta inmunitaria (módulos 6 y 7) y la adhesión de leucocitos (módulo 12). Los módulos restantes hacían referencia a otras funciones como la apoptosis, la hemostasia, el transporte y localización de proteínas o la organización del citoesqueleto. La figura 9A muestra una representación de los distintos módulos funcionales identificados y del grado de interconexión existente entre cada uno de ellos.

El análisis de los genes diferencialmente expresados tras el tratamiento de los cultivos primarios de monocitos con LPS reveló un enriquecimiento en procesos biológicos relacionados con la respuesta defensiva, incluyendo la respuesta al estrés (módulos 1 y 2), la respuesta inmunitaria y, concretamente, la respuesta innata (módulos 1, 2, 3 y 12), la respuesta a estímulos (módulos 1 y 5), la respuesta inflamatoria (módulos 2, 3 y 5), la respuesta a citoquinas (módulos 1, 11 y 18) y la migración de leucocitos (módulos 3 y 16), entre otros (figura 9B). Del mismo modo que se observaba en condiciones basales, entre los módulos enriquecidos también se encontraron otros procesos relacionados con la apoptosis, la hemostasia o procesos generales de regulación proteica.

Finalmente, en cuanto al análisis de los genes diferencialmente expresados únicamente tras la estimulación de los monocitos pero no en condiciones basales mostró 7 módulos funcionales relacionados con la respuesta inmunitaria, la respuesta a estímulos bióticos, la respuesta a citoquinas o la quimiotaxis, entre otros procesos más generales.

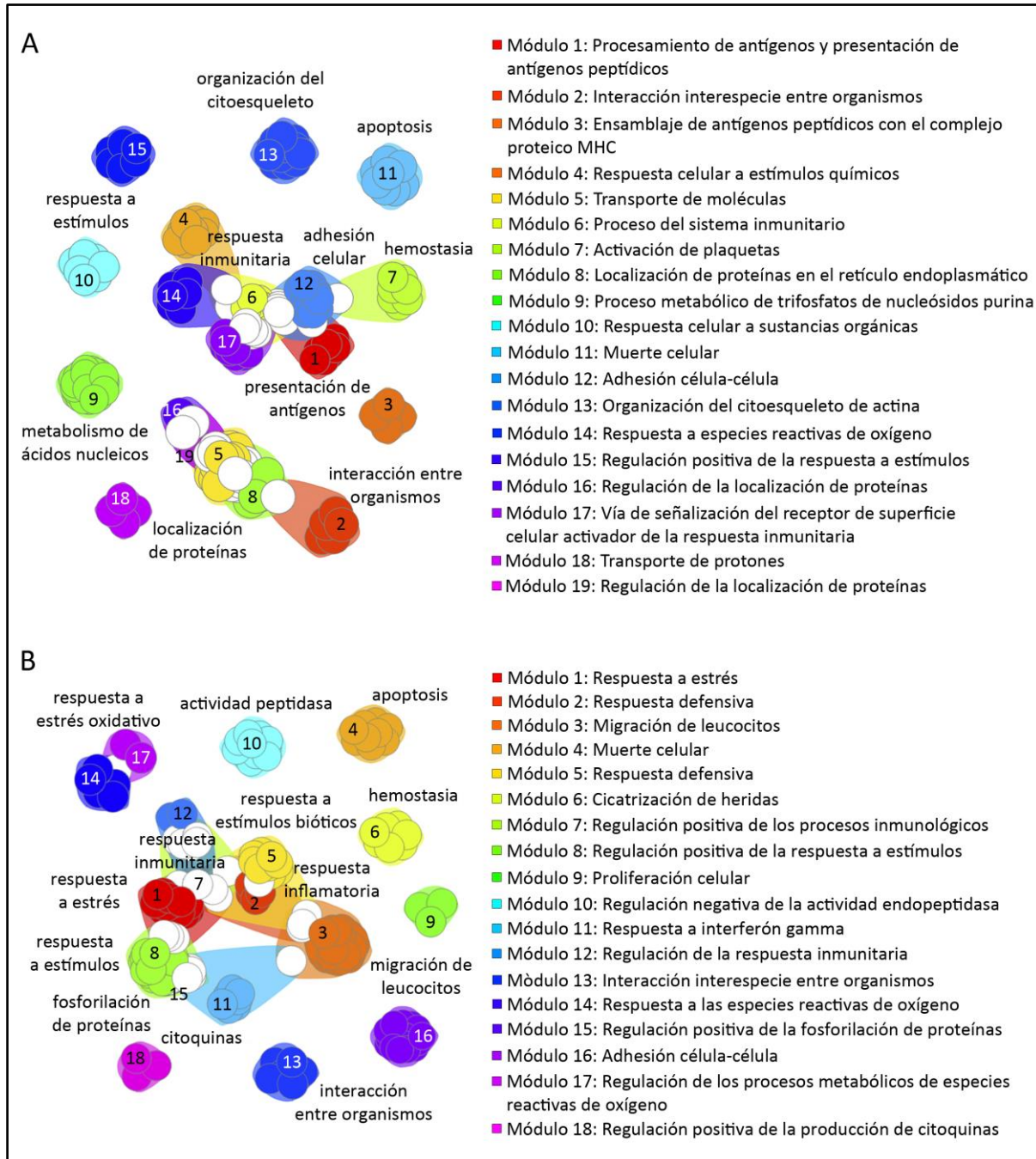


Figura 9. Red de interacción entre los distintos módulos funcionales priorizados para los genes diferencialmente expresados entre pacientes con TOC e individuos control en condiciones basales (A) y tras la estimulación de los monocitos con LPS (B). Cada una de las esferas representa un proceso biológico; los distintos procesos biológicos agrupados en un mismo módulo funcional se muestran del mismo color. Los procesos biológicos que aparecen en más de un módulo funcional se representan en color blanco. El nombre indicado para cada uno de los módulos funcionales se corresponde con el del proceso biológico más significativo para cada uno de ellos.

RESEARCH

Open Access



Inflammatory dysregulation of monocytes in pediatric patients with obsessive-compulsive disorder

Natalia Rodríguez^{1†}, Astrid Morer^{2,6,7†}, E. Azucena González-Navarro^{3,6}, Carles Serra-Pages^{3,5,6}, Daniel Boloc⁴, Teresa Torres¹, Susana García-Cerro¹, Sergi Mas^{1,6,7}, Patricia Gassó^{1,6} and Luisa Lázaro^{2,4,6,7*}

Abstract

Background: Although the exact etiology of obsessive-compulsive disorder (OCD) is unknown, there is growing evidence of a role for immune dysregulation in the pathophysiology of the disease, especially in the innate immune system including the microglia. To test this hypothesis, we studied inflammatory markers in monocytes from pediatric patients with OCD and from healthy controls.

Methods: We determined the percentages of total monocytes, CD16+ monocytes, and classical (CD14^{high}CD16^{low}), intermediate (CD14^{high}CD16^{low}), and non-classical (CD14^{low}CD16^{high}) monocyte subsets in 102 patients with early-onset OCD and in 47 healthy controls. Moreover, proinflammatory cytokine production (GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α) was measured by multiplex Luminex analysis in isolated monocyte cultures, in basal conditions, after exposure to lipopolysaccharide (LPS) to stimulate immune response or after exposure to LPS and the immunosuppressant dexamethasone.

Results: OCD patients had significantly higher percentages of total monocytes and CD16+ monocytes than healthy controls, mainly due to an increase in the intermediate subset but also in the non-classical monocytes. Monocytes from OCD patients released higher amounts of GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α than healthy controls after exposure to LPS. However, there were no significant differences in basal cytokine production or the sensitivity of monocytes to dexamethasone treatment between both groups. Based on monocyte subset distribution and cytokine production after LPS stimulation, patients receiving psychoactive medications seem to have an intermediate inflammatory profile, that is, lower than non-medicated OCD individuals and higher than healthy controls.

Conclusions: These results strongly support the involvement of an enhanced proinflammatory innate immune response in the etiopathogenesis of early-onset OCD.

Keywords: Obsessive-compulsive disorder, Children, Immune system, Microglia, Monocytes, Cytokines, Inflammation

Background

Obsessive-compulsive disorder (OCD) is a neuropsychiatric disease characterized by recurrent obsessions and/or compulsions that are distressing, time-consuming, or significantly impairing [1]. It is the fourth most common psychiatric illness, with a lifetime prevalence of 1–3%

[2]. OCD presents a bimodal distribution for age at onset with a peak at 12–14 years (early-onset) and another at 20–22 years (late-onset). Indeed, in 30–50% of patients, obsessive-compulsive symptoms start to develop in childhood [3, 4]. It has been proposed that childhood-onset OCD may be a distinct form of the disorder with different etiopathogenic mechanisms [4, 5].

Evidence from different lines of research suggest a possible role of immune dysregulation in the pathophysiology of OCD [6–8]. The hypothesis of immune dysregulation in OCD was originally based on the association found between streptococcal infections and the abrupt

* Correspondence: LLAZARO@clinic.cat

†Equal contributors

²Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychology, Institute of Neurosciences, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Department of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

onset of obsessive-compulsive symptoms. In this regard, Swedo et al. reported an increased frequency of obsessive-compulsive symptoms and OCD in children with Sydenham's chorea (SC), a delayed neurological complication following streptococcal infections [9]. The syndrome was named Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections (PANDAS), a subset of childhood tic disorder and/or OCD which may be causally related to group A β -hemolytic streptococcal infection [10, 11]. These findings were confirmed in subsequent studies [12, 13] and were also extended to patients with a past streptococcal infection without SC symptoms [7, 14]. Although there is some controversy, it has been hypothesized that this phenomenon may be due to the production of antibodies against basal ganglia structures [6, 7, 11]. In addition to streptococcus infection, other infectious diseases including *Borrelia burgdorferi*, mycoplasma, *Toxoplasma gondii*, or Borna disease virus have been associated with OCD [7, 15]. As different etiologic factors, both infectious and non-infectious, may be involved, the term PANDAS evolved later to a more wide spectrum of acute neuropsychiatric syndrome named PANS (pediatric acute-onset neuropsychiatric syndrome) [15]. These findings have led to increased interest in the involvement of immunological mechanisms in the etiopathogenesis of OCD, regardless of whether it fulfills the diagnostic criteria for PANDAS or not. Some studies have suggested a dysregulation of the immune function in OCD based on alterations in innate and adaptive immune-related parameters such as proinflammatory cytokine levels [16–18], antineural antibodies [8, 19, 20], or hypothalamus-pituitary-adrenal axis dysregulation [21, 22]. However, the results to date are inconclusive.

Several lines of evidence suggest that dysfunction of innate immunity, including the microglia, the brain's resident immune cells derived from the monocyte lineage, may occur in a number of neuropsychiatric conditions [23–26]. The innate immune system has a pivotal role in initiating, directing, and prolonging the immune response. The main immune cells involved in innate response are monocytes, which circulate in the blood, promote rapid responses, and orchestrate inflammation through the release of proinflammatory cytokines [27]. In addition, this system participates in neuroprotection and neurodevelopment [28]. Human blood monocytes are a heterogeneous population that can be segregated into three functionally different subsets based on their expression of CD14 and CD16: classical (CD14^{high}CD16⁻), intermediate (CD14^{high}CD16^{low}), and non-classical (CD14^{low}CD16^{high}) monocytes [29]. CD16⁺ monocytes (including intermediate and non-classical monocytes [30]) and specifically intermediate monocytes have been termed "proinflammatory" based on their higher production of inflammatory cytokines such as interleukin 6 (IL-6), IL-1 β , and tumor necrosis

factor alpha (TNF- α) and because of the expansion of these cells in infections and inflammatory diseases [30, 31]. However, the particular state of these cells in OCD is not well known.

Hence, to improve our understanding of the potential role of the innate immune dysregulation in early-onset OCD, we aimed (1) to characterize the monocyte subsets in pediatric patients with OCD and healthy controls, (2) to examine the functionality of cultured monocytes by measuring proinflammatory cytokine and chemokine production after exposure to immune regulators in both OCD and controls, and (3) to explore the relationship of these immune parameters with clinical characteristics of OCD patients.

Methods

Subjects

One hundred and two children and adolescents aged between 8 and 19 years with a current diagnosis of obsessive-compulsive disorder (OCD) according to DSM-IV [32] criteria were recruited from the Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychology at the Hospital Clínic in Barcelona. The Spanish version [33] of the semi-structured diagnostic interview K-SADS-PL (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version) [34] was administered with both parents and the child as informant in order to establish the diagnosis of OCD and to assess past and current psychiatric comorbidity. Patients with psychiatric comorbidities other than OCD were not excluded. In addition, due to the naturalistic design of the study, we allowed the inclusion of patients receiving psychoactive medications. Exclusion criteria included intellectual disability, neurological disorders, and known inflammatory disease. The age of onset of OCD was defined as the age at which patients first displayed significant distress or impairment associated with obsessive-compulsive symptoms. OCD severity was measured at the time of admission using the Children's Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale (CY-BOCS) [35], whose maximum score is 40 points.

Forty-seven healthy controls (age range 11–18 years) were recruited from schools in the same geographical region. Controls and their parents were interviewed with the Spanish version [33] of the K-SADS-PL to assess current and past psychopathology. Subjects with a personal history of psychiatric disorders, intellectual disability, and other neurological illness or known inflammatory disease were excluded.

All subjects were recruited between 2010 and 2014. All participants denied the use of alcohol or other recreational drugs during the semi-structured interview. All procedures were approved by the hospital's ethics committee. Written informed consent was obtained from all

parents and verbal informed consent was given by all subjects following an explanation of the procedures involved.

Isolation of peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

Blood samples of both OCD patients and healthy individuals were collected in BD Vacutainer tubes containing acid citrate dextrose (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) for immune cell preparation. All samples were taken during the morning, before 12 p.m. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) suspensions were prepared by density gradient centrifugation over Ficoll-Plaque (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden) at $750\times g$ for 20 min at 18 °C. After washing the interphase cells with phosphate-buffered saline (PBS), PBMCs were frozen in fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) containing 10% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and stored in liquid nitrogen until subsequent trials in order to test patient and control immune cells in the same series of experiments and thus to avoid batch effects/interassay variation.

For subsequent analysis, cryopreserved PBMCs were rapidly thawed and washed with RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and 50 units/mL Benzoylarginine nucleoside (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Cells were counted using an Ac-T diff™ automated analyzer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA).

Flow cytometric analysis

To investigate whether the composition of peripheral monocytes is altered in early-onset OCD, a FACS-based analysis was performed. For this purpose, an aliquot of thawed PBMC containing at least 50,000 cells was washed with PBS and stained with fixable viability dye (eBioscience, San Diego, CA, USA) for 10 min at room temperature, followed by surface staining for 20 min with anti-HLA-DR-V500, anti-CD14-Per-Cy7, and anti-CD16-FITC antibodies (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). After incubation, cells were analyzed by flow cytometry on a BD FACSCanto II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) using appropriate color compensation to correct for spectral overlap and autofluorescence. Data were analyzed with FlowJo version 10.1r5 software (Ashland, OR, USA). The gating strategy for identification of monocyte subsets is shown in Additional file 1: Figure S1. Firstly, the putative monocyte population was gated based on forward and side scatter profiles. Then, after selecting viable cells, monocytes were discriminated from the rest of leukocytes based on high expression of HLA-DR. Finally, the different patterns of expression of CD14 and CD16 allowed the identification of the three

monocyte subsets: classical (CD14^{high}CD16⁻), intermediate (CD14^{high}CD16^{low}), and non-classical (CD14^{low}CD16^{high}) monocytes. Isotype-matched control antibodies were used to determine the cutoff between negative and positive CD16. The combination of intermediate and non-classical monocytes in a single population was considered as CD16⁺ monocytes. Total monocytes were considered as the sum of classical, intermediate, and non-classical monocytes. Percentages of total monocytes, classical, intermediate, and non-classical monocyte subsets, and all CD16⁺ monocytes were assessed. Only samples with at least 200 total monocytes were included in the statistical analysis (91 early-onset OCD and 34 healthy controls).

Purification, culture, and stimulation of peripheral monocytes

For the subsequent assessment of monocyte functionality, monocytes were purified from PBMC by negative selection using an indirect magnetic labeling system (MACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, non-monocytes, such as T cells, NK cells, B cells, and dendritic cells, were labeled using a cocktail of biotin-conjugated antibodies and anti-biotin microbeads. These magnetically labeled non-monocytes were depleted by being retained on a MACS® Column in the magnetic field of a MACS Separator while the unlabeled monocytes passed through the column. This kit allowed the simultaneous enrichment of classical, intermediate, and non-classical monocytes. Purity of isolated monocytes was checked by flow cytometry (routinely > 95). No monocytes were purified from one sample from an OCD patient and one from a healthy control, despite following the same protocol.

Purified monocytes (101 OCD patients and 46 controls) were seeded at a density of 1.5×10^5 cells/well on 24-well plates and allowed to rest for 2 h in RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C prior to stimulation. To characterize monocyte functionality, monocytes were exposed to lipopolysaccharide (LPS), which is the major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, in order to stimulate the immune response, and dexamethasone, a glucocorticoid known to have immunosuppressive properties, to test monocyte sensitivity to immunoregulation. Hence, after resting for 2 h, monocytes were preincubated for 30 min with or without 100 nM dexamethasone followed by stimulation for 24 h with 1 ng/mL LPS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). LPS was dissolved in culture medium whereas a stock solution of dexamethasone (1 mg/mL) was prepared in ethanol and further diluted in culture medium. Ethanol had no effect on monocyte cultures at

the concentration used in the experiment (final ratio of 1/25000). Hence, sterile culture medium was used as negative control for all conditions. After 24 h of incubation, a supernatant was collected and cells were frozen. Supernatants were stored at -20°C until subsequent analysis.

Cytokine quantification in cell culture supernatant

For the analysis of monocyte functionality, inflammatory cytokine levels in culture supernatants were measured in basal conditions and after LPS or dexamethasone plus LPS exposure of purified monocytes using multiplex bead-based sandwich immunoassay with Luminex xMAP® technology (Luminex, Austin, TX, USA). A commercially available 5-plex panel including proinflammatory cytokines and chemokines (IL-1 β , IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), TNF- α , and IL-8) (cat no. LHC0003, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used following the manufacturer's instructions. Briefly, supernatants (25 μL) and standards were incubated with cytokine-specific capture antibodies coupled to fluorescent beads. Then, biotinylated detector antibodies were added, followed by streptavidin-phycoerythrin incubation. All standards and samples were analyzed in duplicate. Data were acquired using Luminex 200 system and analyzed with xPonent v3.1 software (Luminex, Austin, TX, USA). Cytokine levels were quantified using a five-parameter logistic regression curve derived from the reference cytokine concentration standards supplied by the manufacturer. The sensitivity of the assay allowed the detection of cytokine concentrations within the following ranges: IL-1 β 0.33–6800 pg/mL, IL-6 0.25–5000 pg/mL, GM-CSF 0.77–15,400 pg/mL, TNF- α 0.36–7300 pg/mL, IL-8 0.47–9500 pg/mL. For experimental data above the range of the standard curve, the values were extrapolated, whereas samples below the lower limit of quantitation were assigned a value of one half of the minimum detection level for that cytokine as reported in previous studies [36, 37]. For the vast majority of the cytokines and assay conditions, at least 80% of the samples were within the limits of quantification. For some samples, it was not possible to determine cytokine concentration and so the following numbers of samples were included in the statistical analysis for each cytokine: IL-1 β , 100 OCD and 43 controls; IL-6, 79 OCD and 39 controls; GM-CSF, 100 OCD and 44 controls; TNF- α , 98 OCD and 44 controls; and IL-8, 79 OCD and 40 controls.

In order to assess inflammatory activation of peripheral monocytes upon an immune challenge, percentages of cytokine production with respect to untreated sample were calculated for each cytokine level after treatment with LPS alone or LPS plus dexamethasone. Besides, to estimate monocyte sensitivity to dexamethasone, differences in cytokine concentrations between LPS-treated and LPS +

dexamethasone-treated samples were computed and expressed as percentages with respect to LPS stimulation.

Statistical analysis

Data were analyzed using IBM SPSS statistics 20 (IBM Corp., Chicago, IL, USA). Normality was assessed using Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. The different immune parameters, including all percentages of monocyte subsets and the five cytokine levels in basal conditions and after LPS or LPS + dexamethasone treatment, were found to follow a non-normal distribution. Therefore, all variables were natural-log-transformed for subsequent analysis. In order to test differences in sociodemographic variables between patients and controls, Student's *t* test for continuous variables and chi-square test for categorical variables were used. Pearson's test was also used to assess correlations. Univariate analyses were performed adjusting for gender and age to assess the difference in immune parameters between patients and controls. When a significant correlation was identified between cytokine levels and monocyte subsets, the corresponding monocyte subpopulation was introduced as a covariate in the univariate analysis. When the immune parameters were found to be associated with OCD, we also assessed their putative relationship with clinical variables such as disease severity, duration of disease, or psychopharmacological status. When appropriate, further pairwise comparison analyses were performed using Bonferroni's post hoc test.

All data are reported as means \pm standard error of the mean (SEM) of the original data, prior to log transformation. All tests were two-tailed and significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Clinical and sociodemographic characteristics of the sample

Demographic and clinical data of patients with OCD and the control group are shown in Table 1. The mean age was 14.78 years for OCD individuals and 16.29 years for healthy controls ($t = -3.608$, $p = 0.0004$). There were 52 boys (51%) and 50 girls (49%) in the case group and 14 boys (29.8%) and 33 (70.2%) girls among the controls ($\chi^2 = 5.86$, $p = 0.016$). The mean symptom severity score in OCD individuals, as assessed by the CY-BOCS scale was 25.97 ± 0.64 ; this high value reflected the pathological condition of patients. Some patients were also diagnosed with internalizing disorders (anxiety or depression disorders) ($N = 46$, 45.1%) or with neurodevelopmental disorders (attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) or tics) ($N = 22$, 21.6%). However, the presence of these comorbidities in some OCD patients does not seem to have an effect on the frequency of

Table 1 Demographic and clinical data of the study population

	OCD patients (N = 102)	Controls (N = 47)	Statistic	p value
Male gender, N (%)	52 (51.0)	14 (29.8)	$\chi^2 = 5.86$	0.016 ^a
Age (mean ± SEM)	14.78 ± 0.26	16.29 ± 0.26	$t = -3.608$	0.0004 ^b
Age of onset (mean ± SEM)	12.95 ± 0.28	–	–	–
Duration of illness, months (mean ± SEM)	24.62 ± 2.44	–	–	–
CY-BOCS score (mean ± SEM)	25.97 ± 0.64	–	–	–
Comorbidities, N (%)				
Anxiety or mood disorders	46 (45.1)	–	–	–
ADHD or tic disorder	22 (21.6)	–	–	–
Treatment, N (%)				
Medicated	82 (80.4)	–	–	–
Antidepressants	59 (72)	–	–	–
Antipsychotics	1 (1.2)	–	–	–
Antidepressants + antipsychotics	22 (26.8)	–	–	–
Non-medicated	20 (19.6)	–	–	–

OCD obsessive compulsive disorder, ADHD attention deficit hyperactivity disorder, CY-BOCS Children's Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale, SEM standard error of the mean

^aChi-square test

^bStudent's *t* test

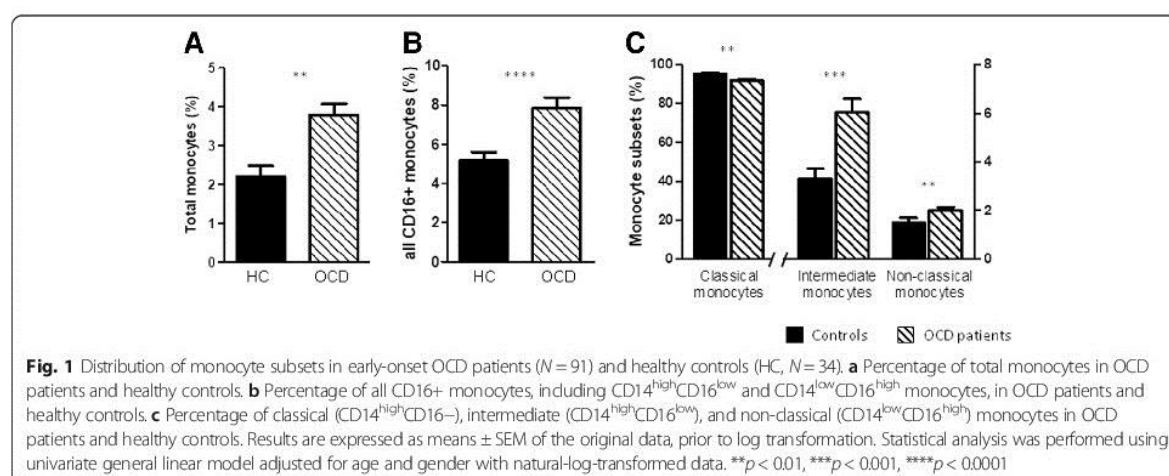
monocyte subsets and cytokine levels, as no differences were found between the groups (Additional file 2: Table S1).

Eighty-two patients (80.4%) received pharmacological treatment with an antidepressant alone ($N = 59$, 72%), an antidepressant combined with antipsychotic drugs ($N = 22$, 26.8%), or an antipsychotic alone ($N = 1$, 1.2%). The most prescribed antidepressant was fluoxetine (in 45.7% of patients receiving antidepressants), whereas the most used antipsychotic was risperidone (in 43.5% of patients taking antipsychotics). Ten patients were comedicated with benzodiazepines (12.2%), four (4.9%) with long-acting methylphenidate, and one (1.2%) with lithium carbonate.

Although a different number of samples was included in the analysis of monocyte subsets and the five pro-inflammatory cytokines, no differences were identified between these populations regarding any of the clinical and sociodemographic characteristics (data not shown).

Enrichment of CD16+ monocytes in peripheral blood of OCD patients

OCD patients presented higher percentages of total monocytes than healthy controls ($F = 7.199$, $p = 0.008$) (Fig. 1a). Regarding different monocyte subsets, CD16+ monocytes were enriched in OCD patients compared to healthy controls ($F = 18.188$, $p = 0.00004$) (Fig. 1b). This effect was



largely driven by a twofold increase in intermediate monocytes in OCD patients ($F = 15.013, p = 0.0002$) (Fig. 1c), although non-classical monocytes were also slightly higher in OCD individuals ($F = 7.107, p = 0.009$). Concurrently, classical monocytes were slightly less frequent in patients than in controls ($F = 10.188, p = 0.002$) (Fig. 1c).

Higher production of inflammatory cytokines in OCD patients

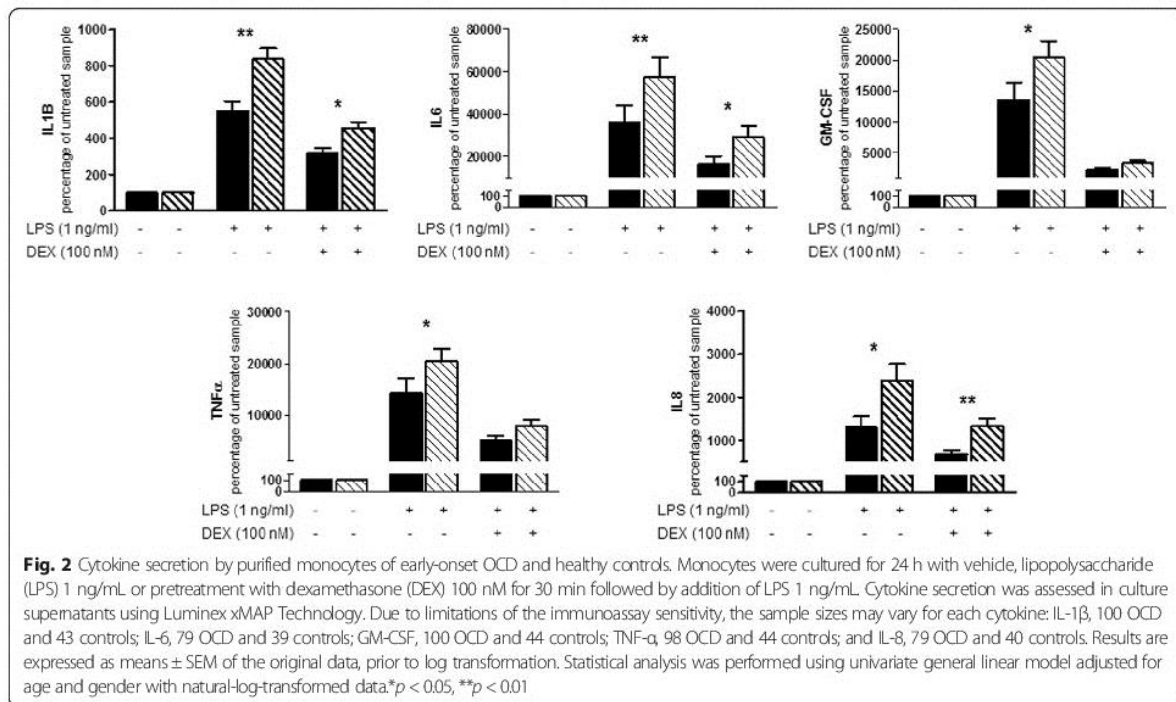
There was a high correlation between the levels of the five different cytokines measured in the study (Additional file 3: Table S2). In addition, cytokine levels were mainly significantly correlated with total monocytes but not with the different monocyte subsets (Additional file 4: Table S3).

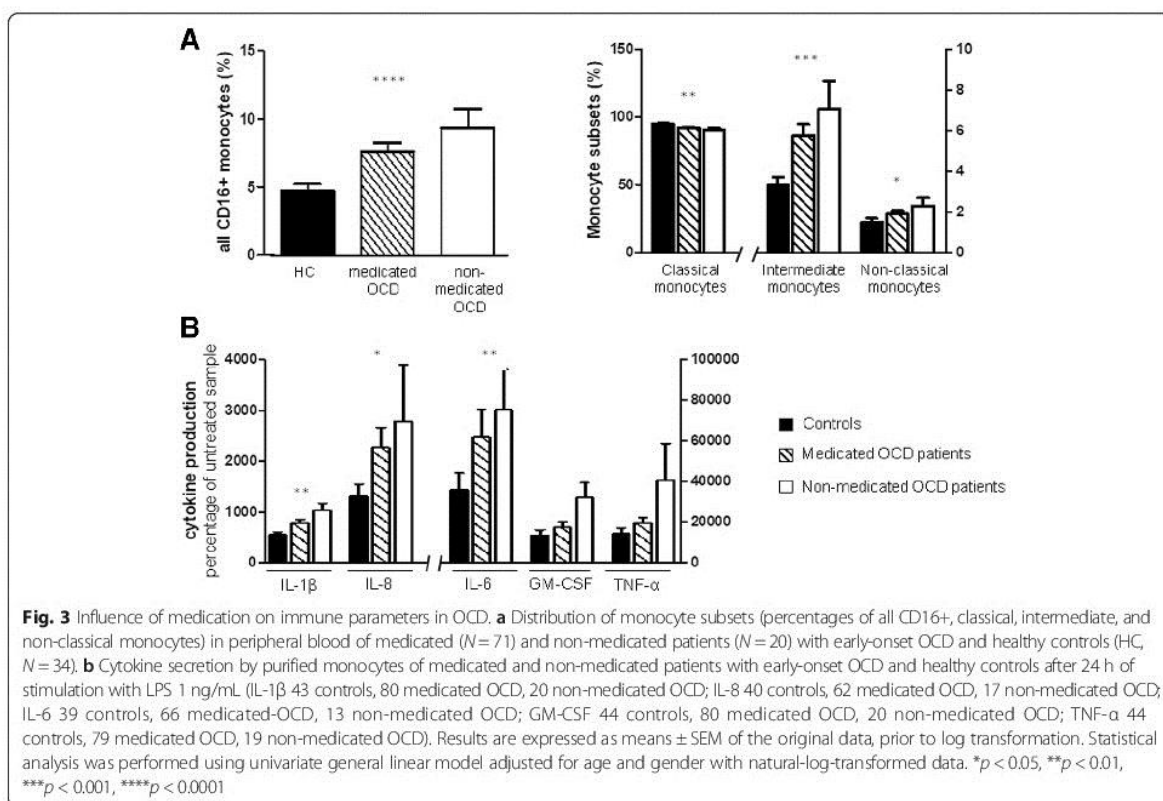
No differences were identified in cytokine levels in basal conditions between patients and controls (Additional file 5: Table S4). Effects of monocyte stimulation with LPS or LPS + dexamethasone are shown in Fig. 2. After LPS treatment, OCD samples showed a significantly higher production of inflammatory cytokines (IL-1 β , $F = 8.216, p = 0.005$; IL-6, $F = 8.570, p = 0.004$; GM-CSF, $F = 4.433, p = 0.049$; TNF- α , $F = 4.241, p = 0.041$; IL-8, $F = 6.330, p = 0.013$) than healthy controls. As expected, cells pretreated with dexamethasone before LPS stimulation released lower quantities of inflammatory cytokines than those treated with LPS alone in both OCD patients and controls. However, cytokine levels after LPS + dexamethasone treatment were still higher than in basal conditions. Due to cytokine production after LPS stimulation, monocytes from OCD

patients released higher quantities of the inflammatory cytokines than healthy controls after LPS + dexamethasone treatment. These differences were only significant for some of the mediators: IL-1 β ($F = 5.528; p = 0.020$), IL-6 ($F = 6.284; p = 0.014$), GM-CSF ($F = 2.205; p = 0.140$), TNF- α ($F = 1.576; p = 0.211$), and IL-8 ($F = 10.326; p = 0.002$). Nevertheless, monocyte sensitivity to dexamethasone expressed as a percentage of reduction in cytokine levels in LPS + dexamethasone-treated monocytes with respect to LPS-stimulated cells did not differ between patients and controls (Additional file 5: Table S4).

Clinical characteristics of OCD patients and immune parameters

We also addressed the possible effects of pharmacological treatment on monocyte distribution and cytokine production in cultured monocytes. We found a progressive increase in CD16+ and intermediate and non-classical subsets from healthy subjects to OCD individuals receiving pharmacological treatment and finally to non-treated patients (CD16+ monocytes $F = 10.372, p = 0.00007$; intermediate monocytes $F = 8.647, p = 0.0003$; non-classical monocytes $F = 3.561, p = 0.032$) (Fig. 3a). In contrast, the direction of this association was reversed for classical monocytes, since the percentage of this subset was higher in healthy individuals than in treated patients and finally in unmedicated patients ($F = 6.620, p = 0.002$) (Fig. 3a). The same pattern was identified for cytokine levels after LPS stimulation: there was a





progressive increase in cytokine concentrations from healthy subjects to OCD patients receiving pharmacological treatment and finally to patients without medication. This association was significant for most cytokines (IL-1 β $F = 5.464$, $p = 0.005$; IL-6 $F = 5.076$, $p = 0.008$; GM-CSF $F = 1.917$, $p = 0.151$; TNF- α $F = 2.102$, $p = 0.126$; and IL8 $F = 4.526$, $p = 0.013$, Fig. 3b). Post hoc comparisons revealed that healthy controls had lower levels of monocyte subsets and proinflammatory cytokines compared to both untreated and treated OCD patients ($p < 0.05$). However, no significant differences were found between OCD individuals receiving psychoactive medications and untreated patients.

In addition, we evaluated the putative relationship of monocyte subset frequency and cytokine production with severity of obsessive-compulsive symptoms as well as with duration of disease. None of the immune parameters were significantly correlated with these clinical variables (Additional file 6: Table S5).

Discussion

To our knowledge, this is the first study to evaluate the distribution of peripheral monocyte subsets and to analyze markers of monocyte activation and functionality in early-onset OCD. Our results revealed a proinflammatory

predisposition of monocytes from OCD patients based on the imbalance of monocyte subpopulations and their over-reactivity to immune stimulation with LPS. Moreover, OCD patients receiving psychoactive medications were found to have an intermediate inflammatory profile compared to untreated patients and controls.

OCD patients showed an increase in the percentage of total monocytes as well as in the CD16+ subset, especially in intermediate monocytes but also in non-classical monocytes, compared with healthy controls. Although there is no previous evidence of an association between altered monocyte frequencies and OCD, some authors have identified high levels of monocytes in related disorders like Tourette's syndrome (TS) [38] or autism spectrum disorder [39, 40]. However, no differences in the monocyte subset distribution have been found [41].

Together with these alterations in monocyte subsets, we found that isolated peripheral blood monocytes from children with OCD behaved abnormally upon stimulation with LPS, displaying excessive IL-1 β , IL-6, GM-CSF, TNF- α , and IL-8 production compared to monocytes from healthy controls. Interestingly, we did not detect any abnormal activation of monocytes from OCD patients in basal conditions, but exposure to an immune challenge was required for the over-reactivity of these

cells. Whether this over-reactivity occurs upon other types of immune stimulus such as psychological stress remains to be elucidated. These findings are at odds with results from previous studies with similar methodologies, which have reported either no differences or lower production of several cytokines after LPS stimulation in OCD individuals [42–45]. However, we should stress that in these studies, the assessments involved different types of samples including other immune cells and all of them were conducted in adult patients, in whom the pathological mechanism may be different [4, 5]. In addition, cytokine production in children has been reported to be different from that in adults [46, 47]. Apart from the studies mentioned above, most authors have investigated cytokine levels in serum or cerebrospinal fluid in OCD [16–18, 47, 48] but the results were inconsistent due to methodological and sample differences such as age, age at onset, disease duration, and pharmacological treatment. Interestingly, in our population, monocytes from pediatric OCD patients were able to respond to glucocorticoid exposure in the same way as those from healthy individuals. However, due to the over-reactivity of monocytes from OCD patients after LPS stimulation, cytokine levels remained higher in patients than in controls when treated with dexamethasone. The significant correlation identified between cytokine levels and the percentage of total monocytes indicates that those individuals with higher production of inflammatory cytokines, both in basal conditions and in response to stimulus, were also those with the higher levels of monocytes and thus with a greater global inflammatory state. However, as all the samples were cultured using the same amount of monocytes, we can rule out that the amount of cytokines released was due to the number of monocytes. In addition, as cytokine levels were mainly not correlated with the different monocyte subsets, the higher production of cytokines must be due to a higher activation of monocytes rather than to monocyte subset distribution.

This study also found that OCD patients receiving pharmacological treatment seem to present an intermediate inflammatory profile (including monocyte subset distribution and cytokine production upon stimulation with LPS) that is lower than non-medicated OCD individuals and higher than healthy controls. These results are in accordance with previous evidence suggesting that treatment with antidepressant medications may have anti-inflammatory properties [49, 50]. However, post hoc analysis was not able to detect significant differences between treated and untreated patients, maybe due to the small size of the non-medicated group. If the trend identified here is confirmed in subsequent studies, the combined treatment with antidepressants and anti-inflammatory drugs like glucocorticoids may be

a promising therapy for improving obsessive-compulsive symptoms, as observed in patients with major depressive disorder or schizophrenia [51, 52]. In addition, other immune-modulating medications, such as anticytokine agents, may be useful as adjunct therapy in OCD individuals, as observed in a patient with tumor necrosis factor receptor-associated autoinflammatory syndrome (TRAPS), in which psychiatric symptoms, including tics and OCD, showed a remarkable improvement after treatment with the IL-1 blocking agent anakinra [53].

Monocytes, which were found to be increased in OCD patients in the present study, are the main cells implicated in the first immune response upon infection. Among the different monocyte subsets, CD16+ and specifically the intermediate monocytes, which were increased in our OCD population, are considered the most inflammatory subpopulation due to their expression of inflammatory cytokines and other activation markers and due to their expansion in infectious and inflammatory diseases [29–31]. Circulating monocytes can be recruited to the central nervous system (CNS) upon exposure to psychosocial stress [25] or when chronic or intense injury occurs in the brain, where they contribute to the inflammatory response with their phagocytic activity and the release of immune mediators such as cytokines [28, 54]. Additionally, peripherally produced cytokines secreted by monocytes, such as the IL-1 β , IL-6, GM-CSF, TNF- α , and IL-8 evaluated in this study, not only act peripherally but also enter the CNS where they increase neuroinflammatory responses and affect neurotransmitter availability [55, 56], brain function, and neurodevelopment [57]. These effects occur mainly in the basal ganglia and dorsal anterior cingulate cortex [58], which have been implicated in the pathophysiology of OCD [59]. Hence, monocyte activation upon immune challenges and other potential stressors in genetically susceptible individuals may be involved in the onset, progression, and exacerbation of obsessive-compulsive symptoms, as proposed for other psychiatric diseases such as schizophrenia [23, 60], depression [58] or anxiety [21]. This peripheral activation of monocytes may also suggest microglial activation, since they are the innate immune cells of the CNS. Although microglia originate from myeloid precursors deriving from the yolk sac during embryonic development, with minimal contribution of bone marrow-derived progenitors in adulthood [54, 61], monocytes and microglial cells may exhibit similar responses to systemic stimuli [54, 62]. Activated microglia with a proinflammatory phenotype are unable to remove debris and promote regeneration of the inflamed tissue leading to a failure in immune resolution and neuroprotection [28]. In addition, microglial abnormalities may lead to alterations of synaptic pruning as well as higher release of microglial-derived

glutamate, which in turn might have neurotoxic effects on dendrites and synapses [63]. Indeed, it has been suggested that microglial dysregulation may have a role in the pathophysiology of OCD and related diseases like TS or autism. *Postmortem* studies evaluating gene expression in basal ganglia from TS subjects identified an increase in the expression of monocyte chemoattractant factor-1 (MCP-1) [64] and an upregulation of several microglia-related genes [65], pointing to microglia proliferation and activation. In addition, animal models such as *Hoxb8* knockout mice or *L-histidine decarboxylase (Hdc)* knockout mice, exhibiting repetitive behaviors, mostly grooming, have also suggested the participation of microglia in the development of OCD and TS [63, 66, 67].

Taken together, our results indicate an enhanced proinflammatory state in monocytes in early-onset OCD characterized by alterations in monocyte subset distribution as well as higher production of inflammatory cytokines after monocyte stimulation. It should be borne in mind that our sample comprised OCD patients with a variety of comorbidities and that most patients were receiving pharmacological treatment. However, the higher activation state of monocytes from OCD patients identified here was not due to the presence of these conditions. We should also stress the homogeneity of our OCD sample in terms of age, age at onset, or duration of disease, as all participants were children and adolescents; this avoids the possible influence of these confounding factors and allows the study of the specific etiopathogenic mechanism underlying childhood-onset OCD, which may differ from the pathophysiology of the adult disorder [5]. In addition, a larger size of the control sample, at least similar to that of the OCD group, would be preferred. However, due to the frequent difficulties found in the recruitment of healthy children and adolescents, we were not able to include a higher number of controls. Moreover, despite the imbalance in gender between OCD patients and healthy controls and the age difference between the groups, the results of the univariate analysis adjusted for these two factors revealed that the association between OCD and immune parameters that was identified here was independent of their potential confounding effect.

As we used a primary model of isolated monocytes, the enhanced proinflammatory state in OCD patients shown in this study was not influenced by the immune response mediated by other immune cells. This means that we can specifically determine the potential contribution of monocyte lineage cells to the inflammatory response in early-onset OCD. Nevertheless, although the over-activation of monocytes found in the present study was demonstrated by a number of parameters, only peripheral activation markers were measured. Hence, even though peripheral monocytes and circulating cytokines

are able to enter the brain [55] and although these peripheral changes may also reflect microglial activation [23], analysis of more inflammatory markers, including central immune changes, is needed in order to understand the complex inflammatory profile underlying OCD. In addition to these limitations, it should also be borne in mind that no adjustments for multiple comparisons were applied due to the exploratory nature of the study and the high correlation of the monocyte-derived products. Hence, the results should be interpreted with caution.

Conclusions

In conclusion, the results of the present study point to a proinflammatory state of monocytes from children and adolescents with OCD. The enhanced activation of the innate immune system may be triggered by exposure to immunomodulatory stimuli like stress or infections leading to an increased production of cytokines that mediate the inflammatory process. Further studies are necessary to elucidate the role of innate immunity in the complex pathophysiology of OCD and to understand the interplay between neural and immune cells throughout the different stages of development.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Gating strategy for identification of monocyte subpopulations. (DOCX 324 kb)

Additional file 2: Table S1. Analysis of the percentages of total monocytes, monocyte subpopulations, and cytokine levels after LPS stimulation of purified monocytes in early-onset OCD diagnosed with different comorbidities. (DOCX 22 kb)

Additional file 3: Table S2. Correlations between the five proinflammatory cytokines measured in the study in basal conditions and after LPS or LPS-dexamethasone stimulation. (DOCX 21 kb)

Additional file 4: Table S3. Correlations between the monocyte subsets and the levels of the five proinflammatory cytokines measured in the study in basal conditions and after LPS or LPS-dexamethasone stimulation. (DOCX 23 kb)

Additional file 5: Table S4. Cytokine secretion by purified monocytes of early-onset OCD and healthy controls. (DOCX 24 kb)

Additional file 6: Table S5. Correlations of the duration of disease (expressed in months) and symptom severity (assessed by CY-BOCS score), with the percentage of total monocytes, monocyte subpopulations, and cytokine levels after LPS stimulation of monocytes in early-onset OCD. (DOCX 13 kb)

Abbreviations

ADHD: Attention deficit hyperactivity disorder; CNS: Central nervous system; CY-BOCS: Children's Yale-Brown obsessive-compulsive scale; DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; FBS: Fetal bovine serum; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL-1: Interleukin 1; IL-1 β : Interleukin 1 beta; IL-6: Interleukin 6; IL-8: Interleukin 8; K-SADS-PL: Schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children-present and lifetime version; LPS: Lipopolysaccharide; OCD: Obsessive-compulsive disorder; PANDAS: Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; PBS: Phosphate buffer saline; SC: Sydenham's chorea; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; TRAPS: Tumor necrosis factor receptor-associated autoinflammatory syndrome; TS: Tourette's syndrome

Acknowledgements

The authors thank the Language Advisory Service at the University of Barcelona, Spain, for manuscript revision. The authors also thank all subjects and their families for the time and effort spent on this study as well as Ana Meseguer for sample collection assistance.

Funding

This study was supported by the Alicia Koplowitz Foundation; the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (P113/01767); Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (grant FPU14/06834 for D.B.), University of Barcelona (grant APIF2015_24782 for N.R.); and Hospital Clínic de Barcelona (grant Josep Font for EAGN). Support was also given by the "Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i Recerca" (AGAUR) of the "Generalitat de Catalunya" to the "Child Psychiatry and Psychology Group" (2014 SGR 489) and to the "Clinical Pharmacology and Pharmacogenetics Group" (2014 SGR 436).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

NR and AM participated in designing and carrying out of the experimental procedures, performing the statistical analyses and the interpretation of results, and writing the first draft of the manuscript. EAGN, DB, TT, and SGC participated in carrying out the experimental procedures and helped in the drafting of the manuscript. PG, SM, and CS participated in the design of the study, the interpretation of the results, and the drafting of the manuscript. LZ and AM participated in the coordination, conceiving, and design of the study and helped in the drafting of the manuscript. LZ and AM provided clinical samples, helped in the drafting of the manuscript, and acquired funding for the research. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All procedures were approved by the hospital's ethics committee. Written informed consent was obtained from all parents and verbal informed consent was given by all subjects following an explanation of the procedures involved.

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of Basic Clinical Practice, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ²Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychology, Institute of Neurosciences, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain. ³Immunology Service, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁴Department of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁵Department of Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁶Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. ⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, Spain.

Received: 4 October 2017 Accepted: 13 December 2017

Published online: 28 December 2017

References

- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Washington: American Psychiatric Press; 2013.
- Ruscio A, Stein D, Chiu W, Kessler R. The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Mol Psychiatry*. 2010;15:53–63.
- Stewart SE, Geller DA, Jenike M, Pauls D, Shaw D, Mullin B, et al. Long-term outcome of pediatric obsessive-compulsive disorder: a meta-analysis and qualitative review of the literature. *Acta Psychiatr Scand*. 2004;110:4–13.
- Dell'Osso B, Benatti B, Hollander E, Fineberg N, Stein DJ, Lochner C, et al. Childhood, adolescent and adult age at onset and related clinical correlates in obsessive-compulsive disorder: a report from the International College of Obsessive-Compulsive Spectrum Disorders (ICOCs). *Int J Psychiatry Clin Pract*. 2016;20:210–7.
- Taylor S. Early versus late onset obsessive-compulsive disorder: evidence for distinct subtypes. *Clin Psychol Rev*. 2011;31:1083–100.
- da Rocha FF, Correa H, Teixeira AL. Obsessive-compulsive disorder and immunology: a review. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 2008;32:1139–1146.
- Teixeira AL, Rodrigues DH, Marques AH, Miguel EC, Fontenelle LF. Searching for the immune basis of obsessive-compulsive disorder. *Neuroimmunomodulation*. 2014;21:152–8.
- Morer A, Viñas O, Lázaro L, Calvo R, Andrés S, Bosch J, et al. Subtyping obsessive-compulsive disorder: clinical and immunological findings in child and adult onset. *J Psychiatr Res*. 2006;40:207–13.
- Swedo S, Rapoport J, Cheslow D, Leonard H, Ayoub E, Hosier D, et al. High-prevalence of obsessive-compulsive symptoms in patients with Sydenham's chorea. *Am J Psychiatry*. 1989;146:246–9.
- Swedo SE, Leonard HL, Garvey M, Mittleman B, Allen AJ, Perlmutter S, et al. Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: clinical description of the first 50 cases. *Am J Psychiatry*. 1998;155:264–71.
- Macerollo A, Martino D. Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections (PANDAS): an evolving concept. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2013;3 <http://tremorjournal.org/article/view/167>
- Mercadante MT, Busatto GF, Lombroso PJ, Prado L, Rosario-Campos MC, do Valle R, et al. The psychiatric symptoms of rheumatic fever. *Am J Psychiatry*. 2000;157:2036–8.
- Asbahr FR, Garvey MA, Snider LA, Zanetta DM, Elkins H, Swedo SE. Obsessive-compulsive symptoms among patients with Sydenham chorea. *Biol Psychiatry*. 2005;57:1073–6.
- Allen AJ, Leonard HL, Swedo SE. Case study: a new infection-triggered, autoimmune subtype of pediatric OCD and Tourette's syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1995;34:307–11.
- Swedo SE, Leckman JF, Rose NR. From research subgroup to clinical syndrome: modifying the PANDAS criteria to describe PANS (pediatric acute-onset neuropsychiatric syndrome). *Pediatr Ther*. 2012;2:113.
- Gray SM, Bloch MH. Systematic review of proinflammatory cytokines in obsessive-compulsive disorder. *Curr Psychiatry Rep*. 2012;14:220–8.
- Şimşek Ş, Yüksel T, Çim A, Kaya S. Serum cytokine profiles of children with obsessive-compulsive disorder shows the evidence of autoimmunity. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016;19:1–6.
- Rao NP, Venkatasubramanian G, Ravi V, Kalmady S, Cherian A, Yc JR. Plasma cytokine abnormalities in drug-naive, comorbidity-free obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res*. 2015;229:949–52.
- Dale RC, Heyman I, Giovannoni G, Church AWJ. Incidence of anti-brain antibodies in children with obsessive-compulsive disorder. *Br J Psychiatry*. 2005;187:314–9.
- Morer A, Lázaro L, Sabater L, Massana J, Castro J, Graus F. Antineuronal antibodies in a group of children with obsessive-compulsive disorder and Tourette syndrome. *J Psychiatr Res*. 2008;42:64–8.
- Furtado M, Katzman MA. Neuroinflammatory pathways in anxiety, posttraumatic stress, and obsessive compulsive disorders. *Psychiatry Res*. 2015;229:37–48.
- Şimşek Ş, Gençoğlu S, Yüksel T, Kaplan İ, Alaca R. Cortisol and brain-derived neurotrophic factor levels prior to treatment in children with obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychiatry*. 2016;77:e855–9.
- Bergink V, Gibney SM, Drexhage HA. Autoimmunity, inflammation, and psychosis: a search for peripheral markers. *Biol Psychiatry*. 2014;75:324–31.
- Beumer W, Gibney SM, Drexhage RC, Pont-Lezica L, Doorduyn J, Klein HC, et al. The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *J Leukoc Biol*. 2012;92:959–75.
- Wohleb ES, McKim DB, Sheridan JF, Godbout JP. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Front Neurosci*. 2015;8:447.
- Frick LR, Williams K, Pittenger C. Microglial dysregulation in psychiatric disease. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:608654.

27. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669–92.
28. London A, Cohen M, Schwartz M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:34.
29. Wong KL, Yeap WH, Tai JY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*. 2012;53:41–57.
30. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81:584–92.
31. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TPJ. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol*. 2013;4:23.
32. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th ed. Washington: American Psychiatric Press; 1994.
33. Ulloa RE, Ortiz S, Higuera F, Nogales I, Fresán A, Apiquian R, et al. Interrater reliability of the Spanish version of schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children-present and lifetime version (K-SADS-PL). *Actas Esp Psiquiatr*. 2006;34:36–40.
34. Kaufman J, Birmaher B, Brent D, Rao U, Flynn C, Moreci P, et al. Schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children-present and lifetime version (K-SADS-PL): initial reliability and validity data. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997;36:980–8.
35. Scahill L, Riddle MA, McSwiggan-Hardin M, Ort SI, King RA, Goodman WK, et al. Children's Yale-Brown obsessive compulsive scale: reliability and validity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997;36:844–52.
36. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*. 2011;25:40–5.
37. Manzano AM, Henkhaus R, Dhillon S, Butler MG. Plasma cytokine levels in children with autistic disorder and unrelated siblings. *Int J Dev Neurosci*. 2012;30:121–7.
38. Matz J, Krause DL, Dehning S, Riedel M, Gruber R, Schwarz MJ, et al. Altered monocyte activation markers in Tourette's syndrome: a case-control study. *BMC Psychiatry*. 2012;12:29.
39. Denney DR, Frei BW, Gaffney GR. Lymphocyte subsets and interleukin-2 receptors in autistic children. *J Autism Dev Disord*. 1996;26:87–97.
40. Sweeten TL, Posey DJ, McDougle CJ. High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. *Am J Psychiatry*. 2003;160:1691–3.
41. Enstrom AM, Onore CE, Van De Water JA. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*. 2010;24:64–71.
42. Fluitman S, Denys D, Vulink N, Schutters S, Heijnen C, Westenberg H. Lipopolysaccharide-induced cytokine production in obsessive-compulsive disorder and generalized social anxiety disorder. *Psychiatry Res*. 2010;178:313–6.
43. Fluitman SB, Denys DA, Heijnen CJ, Westenberg HG. Disgust affects TNF- α , IL-6 and noradrenalin levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35:906–11.
44. Denys D, Fluitman S, Kavelaars A, Heijnen C, Westenberg H. Decreased TNF- α and NK activity in obsessive-compulsive disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2004;29:945–52.
45. Denys D, Fluitman S, Kavelaars A, Heijnen C, Westenberg HGM. Effects of paroxetine and venlafaxine on immune parameters in patients with obsessive compulsive disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2006;31:355–60.
46. Lilić D, Cant AJ, Abinun M, Calvert JE, Spickett GP. Cytokine production differs in children and adults. *Pediatr Res*. 1997;42:237–40.
47. Konuk N, Tekin IO, Öztürk U, Atik L, Atasoy N, Bektas S, et al. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in obsessive compulsive disorder. *Mediat Inflamm*. 2007;2007:65704.
48. Gabbay V, Coffey BJ, Guttman LE, Gottlieb L, Katz Y, Babb JS, et al. A cytokine study in children and adolescents with Tourette's disorder. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 2009;33:967–971.
49. Maes M. The immunoregulatory effects of antidepressants. *Hum Psychopharmacol*. 2001;16:95–103.
50. Caiaffo V, Oliveira BDR, de Sá FB, Evêncio Neto J. Anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activity of fluoxetine. *Pharmacol Res Perspect*. 2016;4:e00231.
51. Na KS, Lee KJ, Lee JS, Cho YS, Jung HY. Efficacy of adjunctive celecoxib treatment for patients with major depressive disorder: a meta-analysis. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 2014;48:79–85.
52. Keller WR, Kum LM, Wehring HJ, Koola MM, Buchanan RW, Kelly DL. A review of anti-inflammatory agents for symptoms of schizophrenia. *J Psychopharmacol*. 2013;27:337–42.
53. Garcia-Delgar B, Morer A, Lubner MJ, Coffey BJ. Obsessive-compulsive disorder, tics, and autoinflammatory diseases: beyond PANDAS. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2016;26:847–50.
54. Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15:300–12.
55. Felger JC, Lotrich FE. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience*. 2013;246:199–229.
56. Dunn A. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res*. 2006;6:52–68.
57. Doherty GH. Developmental switch in the effects of TNF α on ventral midbrain dopaminergic neurons. *Neurosci Res*. 2007;57:296–305.
58. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 2009;65:732–41.
59. Pauls DL, Abramovitch A, Rauch SL, Geller DA. Obsessive-compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15:410–24.
60. Benros ME, Mortensen PB, Eaton WW. Autoimmune diseases and infections as risk factors for schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1262:56–66.
61. Tay TL, Hagemeyer N, Prinz M. The force awakens: insights into the origin and formation of microglia. *Curr Opin Neurobiol*. 2016;39:30–7.
62. Takahashi Y, Yu Z, Sakai M, Tomita H. Linking activation of microglia and peripheral monocyte cells to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:144.
63. Frick L, Pittenger C. Microglial dysregulation in OCD, Tourette syndrome, and PANDAS. *J Immunol Res*. 2016;2016:8606057.
64. Morer A, Chae W, Henegariu O, Bothwell ALM, Leckman JF, Kawikova I. Elevated expression of MCP-1, IL-2 and PTPN-1 in basal ganglia of Tourette syndrome cases. *Brain Behav Immun*. 2010;24:1069–73.
65. Lenington JB, Coppola G, Kataoka-Sasaki Y, Fernandez TV, Palejev D, Li Y, et al. Transcriptome analysis of the human striatum in Tourette syndrome. *Biol Psychiatry*. 2016;79:372–82.
66. Chen S, Tvrdik P, Peden E, Cho S, Wu S, Spangrude G, et al. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell*. 2010;141:775–85.
67. Greer JM, Capecchi MR. Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron*. 2002;33:23–34.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Figure S1

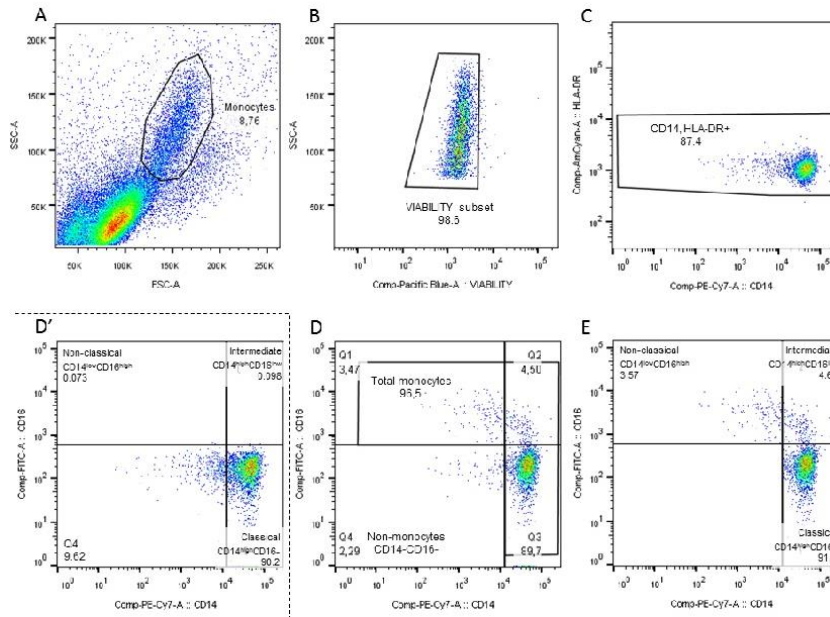


Figure S1: Gating strategy for identification of monocyte subpopulations.

After gating the putative monocyte population on the basis of forward and side scatter profiles (A), viable cells were selected (B). Then, cells were displayed on a HLA-DR and CD14 plot and a gate was set on HLA-DR positive cells (C). Monocyte subpopulations were identified from this gate based on their differential expression of CD14 and CD16 in a dot plot. Non-monocyte cells (CD14⁻, CD16⁻) were excluded (D). A vertical line was placed at the left-hand end of CD14 staining of the classical monocytes. An isotype control was used to determine the cutoff between negative and positive CD16 (D'). CD14^{high}CD16⁻ cells were considered as classical monocytes, CD14^{high}CD16^{low} were taken as intermediate monocytes and CD14^{low}CD16^{high} were considered as non-classical monocytes (E). The combination of intermediate and non-classical monocytes in a single population was considered as CD16⁺ monocytes. Frequency of each monocyte subset is expressed as percentage of total monocytes (classical + intermediate + non-classical subsets).

Table S1. Analysis of the percentages of total monocytes, monocyte subpopulations and cytokine levels after LPS stimulation of purified monocytes in early-onset OCD diagnosed with different comorbidities.

	OCD patients without comorbidities		OCD patients with anxiety or mood disorders		OCD patients with ADHD and/or tics		Statistic <i>F</i>	p-value
	N	Mean \pm SEM	N	Mean \pm SEM	N	Mean \pm SEM		
Total monocytes and monocyte subsets								
Total monocytes (%)	33	4.01 \pm 0.35	40	4.51 \pm 0.49	18	3.76 \pm 0.76	0.20	0.818
CD16+ monocytes ^a	33	6.33 \pm 1.08	40	7.64 \pm 0.77	18	8.02 \pm 1.38	0.24	0.787
Classical monocytes ^a	33	91.44 \pm 1.08	40	92.24 \pm 0.77	18	91.91 \pm 1.37	0.21	0.814
Intermediate monocytes ^a	33	6.48 \pm 0.97	40	5.50 \pm 0.72	18	6.47 \pm 1.37	0.48	0.621
Non-classical monocytes ^a	33	2.04 \pm 0.23	40	2.14 \pm 0.26	18	1.55 \pm 0.18	0.39	0.676
Cytokine secretion after LPS stimulation (% of basal conditions)								
IL-1 β	34	815.05 \pm 77.36	44	877.57 \pm 108.02	22	789.02 \pm 136.18	0.40	0.635
IL-6	26	59 735.15 \pm 15 067.94	31	67 398.48 \pm 18 659.10	22	40 470.45 \pm 13 041.83	0.50	0.254
GM-CSF	34	23 709.67 \pm 5 018.21	44	21 401.99 \pm 4 041.89	22	13 759.87 \pm 3 539.09	1.73	0.024 [#]
TNF- α	34	20 488.82 \pm 3 705.17	42	22 797.90 \pm 4 255.25	22	15 937.19 \pm 3 925.21	0.27	0.312
IL-8	28	2 315.44 \pm 516.20	34	1 672.99 \pm 267.05	17	3 948.24 \pm 1 458.22	0.63	0.902

^a Expressed as percentage of total monocytes. Statistical analysis was performed using univariate general linear model with natural-log-transformed data. Results are expressed as means \pm SEM of the original data, prior to log-transformation.

Significant results are shown in bold. [#] Post-hoc comparisons revealed significant differences between OCD patients with ADHD and/or tics and those without comorbidities (p=0.020) as well as between OCD comorbid with ADHD and/or tics and OCD comorbid with anxiety and/or mood disorders (p=0.033)

Table S2. Correlations between the five proinflammatory cytokines measured in the study in basal conditions and after LPS or LPS-dexamethasone stimulation.

	IL-1 β	IL-6	GM-CSF	TNF- α	IL-8		
N total	143	117	143	141	118		
Cytokine production after LPS stimulation (% of basal conditions)	IL-1 β		R=0.803; p=1.2 x 10⁻²⁷	R=0.668; p=8.1 x 10⁻²⁰	R=0.832; p=2.1 x 10⁻³⁷	R=0.946; p=1.3 x 10⁻⁵⁸	Basal cytokine production (pg/ml)
	IL-6	R=0.672; p=1.1 x 10⁻¹⁶		R=0.671; p=9.5 x 10⁻¹⁷	R=0.891; p=1.7 x 10⁻⁴¹	R=0.852; p=3.7 x 10⁻³⁰	
	GM-CSF	R=0.559; p=4.2 x 10⁻¹³	R=0.615; p=1.3 x 10⁻¹³		R=0.739; p=8.4 x 10⁻²⁶	R=0.630; p=1.7 x 10⁻¹⁴	
	TNF- α	R=0.638; p=1.9 x 10⁻¹⁷	R=0.849; p=6.4 x 10⁻³⁴	R=0.678; p=1.8 x 10⁻²⁰		R=0.858; p=4.8 x 10⁻³⁵	
	IL-8	R=0.550; p=1.2 x 10⁻¹⁰	R=0.610; p=8.3 x 10⁻¹²	R=0.517; p=1.7 x 10⁻⁹	R=0.549; p=1.5 x 10⁻¹⁰		
Sensitivity to dexamethasone ^a	IL-1 β		R=0.591; p=2.2 x 10⁻¹²	R=0.561; p=3.2 x 10⁻¹³	R=0.674; p=5.0 x 10⁻²⁰	R=0.762; p=1.2 x 10⁻²³	LPS + dexamethasone treatment (% of basal conditions)
	IL-6	R=0.565; p=8.8 x 10⁻¹¹		R=0.550; p=1.1 x 10⁻¹⁰	R=0.805; p=4.1 x 10⁻²⁸	R=0.654; p=6.5 x 10⁻¹⁴	
	GM-CSF	R=0.331; p=7.2 x 10⁻⁵	R=0.398; p=1.2 x 10⁻⁵		R=0.650; p=2.0 x 10⁻¹⁸	R=0.635; p=9.3 x 10⁻¹⁵	
	TNF- α	R=0.417; p=4.4 x 10⁻⁷	R=0.556; p=1.1 x 10⁻¹⁰	R=0.250; p=0.003		R=0.632; p=2.2 x 10⁻¹⁴	
	IL-8	R=-0.075; p=0.461	R=0.455; p=6.0 x 10⁻⁶	R=0.187; p=0.061	R=0.142; p=0.160		

^a Measured as percentage of reduction in cytokine levels in LPS+dexamethasone-treated monocytes with respect to LPS-stimulated. Correlations were performed using the Pearson's correlation test. Significant results are shown in bold.

Table S3. Correlations between the monocyte subsets and the levels of the five proinflammatory cytokines measured in the study in basal conditions and after LPS or LPS-dexamethasone stimulation.

		Total monocytes (%)	CD16+ monocytes ^a	Classical monocytes ^a	Intermediate monocytes ^a	Non-classical monocytes ^a
Basal cytokine production (pg/ml)	IL-1 β	R=0.323; p=0.0003	R=0.095; p=0.302	R=-0.023; p=0.800	R=0.077; p=0.401	R=0.087; p=0.344
	IL-6	R=0.276; p=0.006	R=0.126; p=0.220	R=0.039; p=0.707	R=0.077; p=0.458	R=0.167; p=0.103
	GM-CSF	R=0.136; p=0.136	R=0.196; p=0.031	R=-0.222; p=0.014	R=0.222; p=0.014	R=0.005; p=0.952
	TNF- α	R=0.267; p=0.003	R=0.099; p=0.283	R=-0.026; p=0.781	R=0.058; p=0.526	R=0.105; p=0.254
	IL-8	R=0.190; p=0.058	R=-0.045; p=0.658	R=0.132; p=0.189	R=-0.111; p=0.270	R=0.098; p=0.332
Cytokine production after LPS stimulation (% of basal conditions)	IL-1 β	R=0.173; p=0.057	R=0.102; p=0.265	R=-0.017; p=0.852	R=0.023; p=0.799	R=0.176; p=0.053
	IL-6	R=0.133; p=0.198	R=0.078; p=0.448	R=-0.052; p=0.615	R=0.026; p=0.800	R=0.144; p=0.160
	GM-CSF	R=0.446; p=2.6 x 10⁻⁷	R=0.061; p=0.507	R=0.116; p=0.203	R=0.012; p=0.895	R=0.150; p=0.100
	TNF- α	R=0.281; p=0.002	R=0.047; p=0.607	R=0.054; p=0.560	R=-0.007; p=0.944	R=0.159; p=0.083
	IL-8	R=0.310; p=0.002	R=0.178; p=0.076	R=-0.178; p=0.076	R=0.207; p=0.039	R=0.061; p=0.549
LPS + dexamethasone treatment (% of basal conditions)	IL-1 β	R=0.163; p=0.073	R=0.055; p=0.548	R=0.033; p=0.723	R=0.000; p=0.999	R=0.149; p=0.104
	IL-6	R=0.127; p=0.219	R=0.041; p=0.695	R=-0.015; p=0.884	R=-0.004; p=0.969	R=0.118; p=0.254
	GM-CSF	R=0.349; p=8.5 x 10⁻⁵	R=-0.13; p=0.888	R=0.193; p=0.034	R=-0.064; p=0.485	R=0.131; p=0.151
	TNF- α	R=0.190; p=0.038	R=-0.040; p=0.666	R=0.161; p=0.080	R=-0.88; p=0.337	R=0.126; p=0.169
	IL-8	R=0.366; p=0.0002	R=0.172; p=0.087	R=-0.092; p=0.363	R=0.138; p=0.170	R=0.150; p=0.136
Sensitivity to dexamethasone ^b	IL-1 β	R=0.041; p=0.661	R=0.003; p=0.975	R=-0.012; p=0.897	R=-0.015; p=0.868	R=-0.015; p=0.871
	IL-6	R=0.105; p=0.316	R=0.034; p=0.744	R=-0.073; p=0.483	R=0.055; p=0.597	R=-0.033; p=0.754
	GM-CSF	R=0.116; p=0.208	R=0.140; p=0.127	R=-0.085; p=0.358	R=0.149; p=0.105	R=0.038; p=0.684
	TNF- α	R=0.177; p=0.056	R=0.082; p=0.380	R=-0.124; p=0.182	R=0.121; p=0.193	R=-0.035; p=0.708
	IL-8	R=-0.055; p=0.624	R=-0.002; p=0.988	R=-0.106; p=0.341	R=0.136; p=0.220	R=-0.258; p=0.018

^a Measured as percentage of reduction in cytokine levels in LPS+dexamethasone-treated monocytes with respect to LPS-stimulated.

^b Measured as percentage of reduction in cytokine levels in LPS+dexamethasone-treated monocytes with respect to LPS-stimulated.

Correlations were performed using the Pearson's correlation test.

Significant results are shown in bold.

Table S4. Cytokine secretion by purified monocytes of early-onset OCD and healthy controls

	OCD patients		Controls		Statistic <i>F</i>	p-value
	N	mean±SEM	N	mean±SEM		
Basal cytokine production (pg/ml)						
IL-1 β	100	39.67 ± 4.32	43	38.21 ± 5.92	0.026	0.872
IL-6	79	8.37 ± 1.14	39	14.34 ± 4.80	0.136	0.713
GM-CSF	100	1.46 ± 0.67	44	0.96 ± 0.26	0.954	0.330
TNF- α	98	12.86 ± 4.49	44	11.04 ± 4.81	0.073	0.787
IL-8	79	2 357.07 ± 296.34	40	3,306.84 ± 803.93	0.010	0.920
Cytokine production after LPS stimulation (% of basal conditions)						
IL-1 β	100	836.83 ± 61.55	43	550.10 ± 53.39	8.216	0.005**
IL-6	79	57 377.43 ± 9 528.79	39	35 935.84 ± 8 456.03	8.570	0.004**
GM-CSF	100	20 505.34 ± 2 588.55	44	13 563.93 ± 2 762.77	4.433	0.049*
TNF- α	98	20 456.63 ± 2 391.81	44	14 274.75 ± 2 994.06	4.241	0.041*
IL-8	79	2 390.30 ± 386.13	40	1 310.18 ± 245.87	6.330	0.013*
Cytokine production after LPS+dexamethasone treatment (% of basal conditions)						
IL-1 β	100	458.23 ± 32.56	43	319.46 ± 27.03	5.528	0.020*
IL-6	79	23 376.32 ± 4 975.85	39	16 287.88 ± 3 863.47	6.284	0.014*
GM-CSF	100	3 335.04 ± 434.83	44	2 218.67 ± 449.41	2.205	0.140
TNF- α	98	6 974.70 ± 955.62	44	4 956.34 ± 943.60	1.576	0.211
IL-8	79	1 317.75 ± 173.89	40	673.31 ± 95.23	10.326	0.002**
Sensitivity to dexamethasone^a						
IL-1 β	100	40.76 ± 1.68	43	35.77 ± 2.98	1.332	0.251
IL-6	79	49.14 ± 2.35	39	47.68 ± 3.40	0.609	0.437
GM-CSF	100	77.30 ± 1.99	44	71.07 ± 3.67	2.053	0.154
TNF- α	98	63.42 ± 1.89	44	53.37 ± 8.86	3.707	0.056
IL-8	79	23.57 ± 7.39	40	32.54 ± 3.98	0.715	0.400

^a Measured as percentage of reduction in cytokine levels in LPS+dexamethasone-treated monocytes with respect to LPS-stimulated.

*p<0.05, **p<0.01. Significant results are shown in bold. Statistical analysis was performed using univariate general linear model adjusted for age and gender with natural-log-transformed data. Results expressed as means±SEM of the original data, prior to log-transformation.

Table S5. Correlations of the duration of disease (expressed in months) and symptom severity (assessed by CY-BOCS score), with the percentage of total monocytes, monocyte subpopulations and cytokine levels after LPS stimulation of monocytes in early-onset OCD.

	N	CY-BOCS score	Disease duration
Total monocytes and monocyte subsets			
Total monocytes (%)	91	R=-0.080; p=0.453	R=-0.079; p=0.454
CD16+ monocytes ^a	91	R=-0.178; p=0.091	R=0.048; p=0.653
Classical monocytes ^a	91	R=0.187; p=0.076	R=-0.067; p=0.530
Intermediate monocytes ^a	91	R=-0.125; p=0.237	R=-0.098; p=0.355
Non-classical monocytes ^a	91	R=-0.213; p=0.051	R=-0.067; p=0.530
Cytokine secretion after LPS stimulation (% of basal conditions)			
IL-1 β	100	R=-0.010; p=0.921	R=-0.007; p=0.944
IL-6	79	R=-0.168; p=0.140	R=-0.122; p=0.284
GM-CSF	100	R=-0.036; p=0.721	R=-0.062; p=0.538
TNF- α	98	R=-0.114; p=0.265	R=0.017; p=0.866
IL-8	79	R=0.192; p=0.091	R=0.152; p=0.180

CY-BOCS: Children's Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale

^aExpressed as percentage of total monocytes.

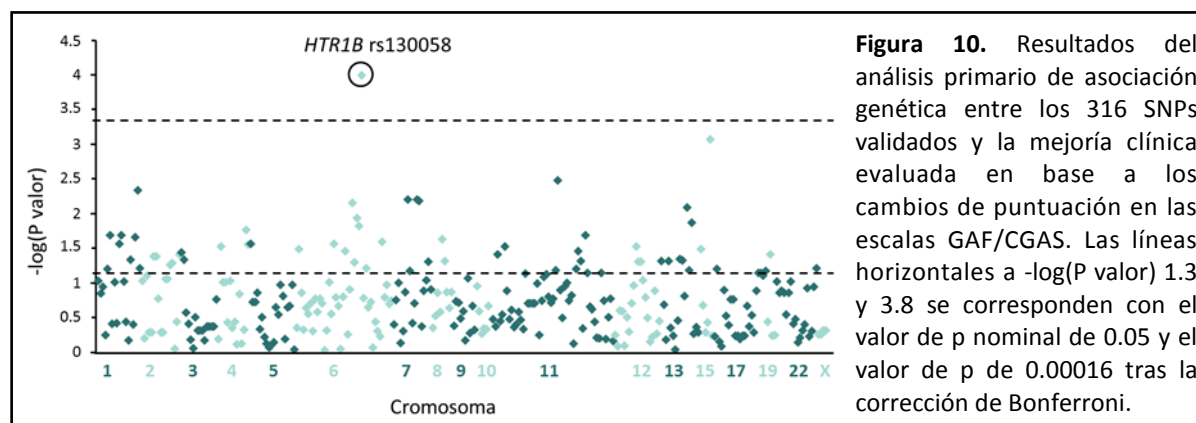
Correlations were performed using the Pearson's correlation test.

4.3 Estudio 3. Farmacogenética de la fluoxetina 1

Mas S, Blázquez A, Rodríguez N, Boloc D, Lafuente A, Arnaiz JA, Lázaro L, Gassó P. **Pharmacogenetic study focused on fluoxetine pharmacodynamics in children and adolescent patients: impact of the serotonin pathway.** *Pharmacogenet Genomics* 2016; 26: 487-496.

El análisis de la respuesta terapéutica a la fluoxetina tras 12 semanas de tratamiento con el fármaco mostró que tanto los pacientes con un diagnóstico principal de TOC como el resto de pacientes (con diagnóstico principal de TDM o TAG) experimentaban una mejoría clínica en base a las distintas escalas. No obstante, se detectaron ciertas diferencias en los cambios de puntuación observados en algunas de las escalas de evaluación entre los distintos diagnósticos. Además, se encontró una correlación significativa entre las puntuaciones basales de cada escala y la respuesta clínica (GAF/CGAS: $r=-0.59$ $p<0.001$; CGI-S: $r=0.60$ $p<0.001$; CDI: $r=0.37$ $p=0.001$; OCI-CV: $r=0.48$ $p<0.001$; SCARED: $r=0.41$ $p<0.001$), observándose una mejor respuesta terapéutica en los pacientes con un peor estado al inicio del tratamiento. En consecuencia, el análisis de asociación genética se ajustó por el diagnóstico y la puntuación basal en la escala correspondiente.

En un primer análisis, se evaluó el efecto de los 316 polimorfismos validados en la respuesta clínica valorada según los cambios en la puntuación en la escala GAF/CGAS, que permite evaluar el estado y la funcionalidad global del paciente. Este análisis permitió identificar un polimorfismo (rs130058) localizado en el gen *HTR1B*, que codifica para el receptor 1B de la serotonina, que se encontraba significativamente asociado con la mejoría clínica tras el tratamiento con fluoxetina durante 12 semanas (figura 10). Los individuos heterocigotos para este polimorfismo mostraron una menor respuesta al tratamiento que los individuos homocigotos ($p=0.00009$).



En base a estos resultados, se llevó a cabo un análisis secundario en el que se evaluó específicamente el efecto de los SNPs localizados en genes implicados en la vía de la serotonina (N=63) sobre la respuesta clínica medida en base a los cambios en las puntuaciones de todas las escalas clínicas evaluadas. Los resultados de este análisis mostraron una asociación significativa entre la mejoría clínica y otro polimorfismo de la vía serotoninérgica (rs4570625), localizado en el gen de la triptófano 5-hidroxilasa 2 (*TPH2*). Los pacientes homocigotos para el alelo minoritario (TT) presentaron una respuesta significativamente superior a la de los portadores del alelo mayoritario (GT y GG) en base a los cambios en la puntuación de la escala CDI ($p=0.00002$). De acuerdo con los resultados del análisis primario, los pacientes heterocigotos para el polimorfismo rs130058 del gen *HTR1B* presentaron una menor mejoría en todas las escalas clínicas de evaluación, con una mayor puntuación en la escala CGI-I ($p=0.0003$) y una menor reducción en la escala CGI-S ($p=0.0009$), CDI ($p=0.04$), OCI-CV ($p=0.002$) y SCARED ($p=0.005$), a pesar de que estas diferencias no fueron significativas tras la corrección de Bonferroni ($p>0.00013$). La evaluación de la respuesta terapéutica en base a los genotipos de los polimorfismos rs130058 (*HTR1B*) y rs4570625 (*TPH2*) se muestra en la figura 11.

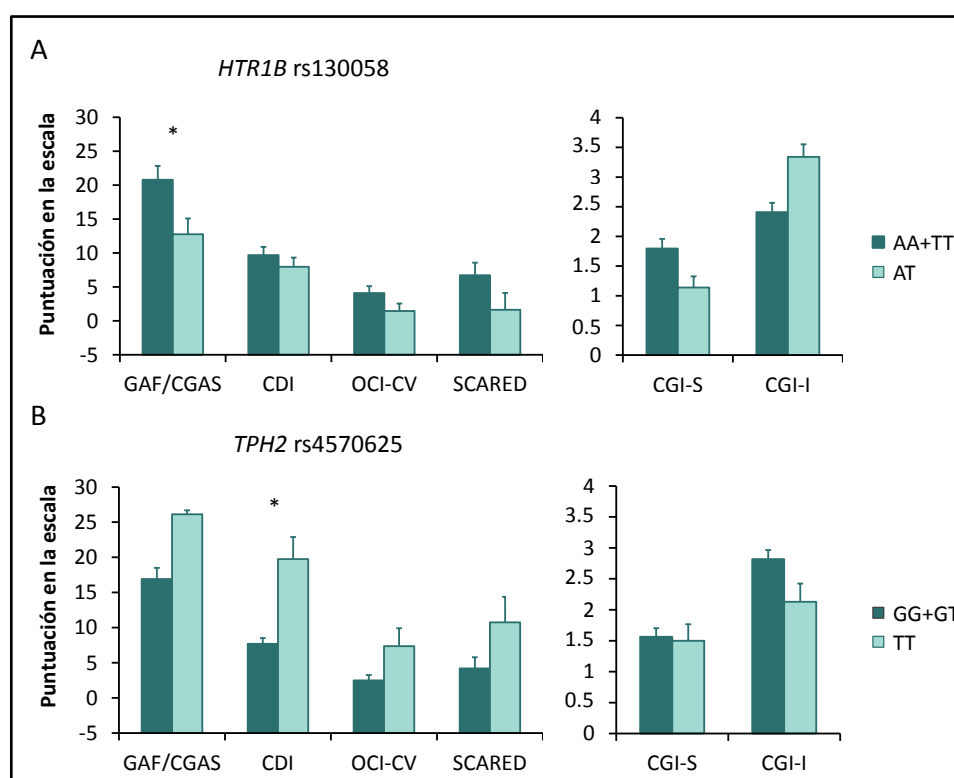


Figura 11. Efecto de los polimorfismos rs130058 del gen *HTR1B* (A) y rs4570625 del gen *TPH2* (B) en la mejoría clínica determinada en base a las diferencias en la puntuación de las distintas escalas tras el tratamiento con fluoxetina. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p<0.00013$, significativo tras la corrección de Bonferroni.

Pharmacogenetic study focused on fluoxetine pharmacodynamics in children and adolescent patients: impact of the serotonin pathway

Sergi Mas^{a,e,f}, Ana Blázquez^c, Natalia Rodríguez^a, Daniel Boloc^a, Amalia Lafuente^{a,e,f}, Joan A. Arnaiz^{a,d,e}, Luisa Lázaro^{b,c,e,f} and Patricia Gassó^{a,e}

Objective Pharmacogenetic studies of fluoxetine in children and adolescents are scarce. After reporting the effect of genetic variants in genes related to the fluoxetine pharmacokinetics on clinical response in a pediatric population, we now evaluate the impact of genetic markers involved in its pharmacodynamics.

Patients and methods The assessment was performed in 83 patients after 12 weeks of fluoxetine treatment. The genetic association analysis included a total of 316 validated single nucleotide polymorphisms in 45 candidate genes involved in six different pathways.

Results Clinical improvement after treatment with fluoxetine in our pediatric population was associated significantly with two polymorphisms located in genes related to the serotonergic system: the 5-hydroxytryptamine receptor 1B (*HTR1B*) and the tryptophan 5-hydroxylase 2 (*TPH2*).

Conclusion Although a wide range of candidate genes related to different pathways were assessed, the results

show that genetic markers directly related to serotonin have an important effect on fluoxetine response.

Pharmacogenetics and Genomics 26:487–496 Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Pharmacogenetics and Genomics 2016, 26:487–496

Keywords: children, fluoxetine, *HTR1B*, pharmacogenetics, polymorphism, *TPH2*

Departments of ^aPathological Anatomy, Pharmacology and Microbiology, ^bPsychiatry and Clinical Psychobiology, University of Barcelona, ^cDepartment of Child and Adolescent Psychiatry and Psychology, Institute of Neurosciences, ^dDepartment of Clinical Pharmacology, Hospital Clinic de Barcelona, ^eAugust Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Barcelona and ^fMental Health Networking Biomedical Research Centre (CIBERSAM), Madrid, Spain

Correspondence to Patricia Gassó, PhD, Department of Pathological Anatomy, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, E-08036 Barcelona, Spain

Tel: +34 93 402 4526; fax: +34 93 403 5881; e-mail: pgasso@ub.edu

or
Joan A. Arnaiz, PhD, Department of Pathological Anatomy, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, E-08036 Barcelona, Spain
Tel: +34 93 402 4526; fax: +34 93403 5881; e-mail: JAARNAIZ@clinic.ub

Received 31 March 2016 Accepted 25 July 2016

Introduction

Fluoxetine is one of the most commonly prescribed selective serotonin reuptake inhibitors. It was launched for the treatment of major depressive disorder (MDD) but its clinical use has been expanded to other psychiatric diseases including obsessive–compulsive disorder (OCD) and generalized anxiety disorder (GAD), showing effectiveness and safety in children and adolescent patients [1–3]. However, there is considerable interindividual variability in the clinical response and a high percentage of patients do not respond to treatment. In this scenario, the prediction of clinical response is needed to individualize treatment and achieve better improvement and prognosis.

Genetic predictors are particularly important as antidepressant response shows familial clustering [4]. The model of inheritance is expected to be complex, likely involving a large number of loci, each with a small effect size. Different strategies can be used to detect the most

important genetic markers, including candidate gene studies and genome-wide association studies. An innovative method in pharmacogenetics is the pathway analysis [5], which is based on the analysis of variants within genes involved in the same biological pathway.

Pharmacogenetic studies involving antidepressants have enabled the identification of the most replicated candidate genes, including *SLC6A4*, *HTR2A*, *BDNF*, and *GNB3* [6]. The majority of these studies have been carried out in adults. In fact, there have been few studies on antidepressants in children and adolescents and their results suggest that age may not influence the pharmacogenetics of antidepressants. However, further investigation is required to confirm this [7].

Previously, our group focused on searching for genetic polymorphisms present in genes related to the pharmacokinetics of fluoxetine. The results showed the involvement of *CYP2D6* polymorphisms in the plasma fluoxetine/norfluoxetine ratio, but not in clinical improvement [8]. These results were consistent with the fact that fluoxetine plasma levels do not determine clinical response [9]. Also, at the pharmacokinetics level,

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website (www.pharmacogeneticsandgenomics.com).

1744-6872 Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1097/FPC.0000000000000240

genetic variants in *ABCB1*, which encodes the membrane transporter P-glycoprotein and therefore could determine fluoxetine brain bioavailability, seems to play a role in clinical response [8]. However, genetic factors other than those related to the fluoxetine pharmacokinetics may be involved in the antidepressant response.

In the present study, we focused on searching for genetic markers related to the pharmacodynamics of fluoxetine. The aims of this study were as follows: (a) to select candidate genes within different pathways directly or indirectly related to fluoxetine's mechanism of action as reported in the literature; (b) to assess the relationship between the selected genes and fluoxetine using different bioinformatics tools; and (c) and to evaluate the influence of polymorphisms within the selected genes on clinical improvement in children and adolescent patients receiving fluoxetine treatment.

Patients and methods

Patients and clinical improvement assessment

Eighty-three children and adolescents aged between 10 and 17 years of age receiving fluoxetine treatment were recruited. Patients were diagnosed with MDD, OCD, or GAD according to the *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. (DSM-IV) [10]. The study was carried out at the Child and Adolescent Psychiatry and Psychology Service of the Institute of Neuroscience at the Hospital Clinic in Barcelona. Exclusion criteria were mental retardation, somatic or neurological diseases, autism, psychotic disorders, and non-White ethnicity. All patients began fluoxetine treatment in the initial phase of the study. Some patients were temporarily comedicated with antipsychotics, benzodiazepines, or mood stabilizers (Table 1).

Information on illness severity was obtained in the initial phase of the study through the assessment of the following scales: the Global Assessment of Functioning (GAF) scale [11] or the Children's Global Assessment Scale (CGAS) [12], the Clinical Global Impression-Severity (CGI-S) scale [13], the Children's Depression Inventory (CDI) [14], the Obsessive-Compulsive Inventory-Child Version (OCI-CV) [15], and the Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED) [16].

To assess clinical improvement, these same scales as well as the CGI-Improvement (CGI-I) scale were administered after 12 weeks of fluoxetine treatment. A total of four patients were not clinically evaluated after 12 weeks of fluoxetine treatment because they were hospitalized in different institutions at that time. Moreover, one patient did not answer the questionnaires of the CDI, OCI-CV, and SCARED scales at week 0. Therefore, missing data did not enable calculation of scores in four (GAF/CGAS, CGI-S, CGI-I scales) or five patients (CDI, OCI-CV, SCARED scales).

Table 1 Demographic and clinical data of the study population

	Patients (N=83)
Sex: male [n (%)]	26 (31.3)
Age (mean±SD) (years)	14.7±1.7
Diagnosis [n (%)]	
MDD	57 (68.7)
OCD	16 (19.3)
GAD	10 (12)
Comedication [n (%)]	
Antipsychotics	9 (10.8)
Benzodiazepines	7 (8.4)
Antipsychotics + benzodiazepines	2 (2.4)
Antipsychotics + mood stabilizers	2 (2.4)
Baseline scale score (mean±SD)	
GAF/CGAS	44.6±11.7
CGI-S	4.8±0.8
CDI	26.1±9.7
OCI-CV	16.2±7.9
SCARED	34.5±13.4
Scale score at week 12 (mean±SD)	
GAF/CGAS	62.3±10.2
CGI-S	3.3±0.87
CGI-I	2.8±1.2
CDI	17.2±10.1
OCI-CV	13.4±7.6
SCARED	29.9±14.7

CDI, Children's Depression Inventory; CGI-I, Clinical Global Impression-Improvement; CGI-S, Clinical Global Impression-Severity; GAD, generalized anxiety disorder; GAF/CGAS, Global Assessment of Functioning/Children's Global Assessment Scale; MDD, major depression disorder; OCD, obsessive-compulsive disorder; OCI-CV, Obsessive-Compulsive Inventory-Child Version; SCARED, Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders.

The GAF/CGAS scales are clinician-administered instruments used to assess both symptom severity and psychosocial functioning. They are numerical scales with a range of scores from 1 to 100, with scores above 70 being considered to be in the normal range [11,12]. In the present study, the CGAS was administered to patients under 12 years of age.

The CGI-S [13] assesses the severity of global symptomatology on a scale of 1 (normal, not at all ill) to 7 (extremely ill) and the CGI-I [13] assesses the adequacy of clinical response since the start of treatment and is also rated on a seven-point scale as follows: 1=very much improved, 2=much improved, 3=minimally improved, 4=no change from baseline, 5=minimally worse, 6=much worse, and 7=very much worse.

The CDI evaluates the presence and severity of specific depressive symptoms in youth. It includes 27 items, each scored from 0 to 2. Depressed children were defined as those with a self-reported CDI score of greater than or equal to 19 [14].

The OCI-CV is a 21-item self-reported measure of obsessive and/or compulsive symptoms for use in youth aged 7–17 years. For each item the child is asked to report the frequency of the emotion or behavior on a three-point scale (0=never, 2=frequently). Scores greater than or equal to 17 are considered to indicate the presence of obsessive and/or compulsive symptoms [15].

The SCARED is a 41-item self-report instrument used to screen for childhood anxiety. For each item, the child is asked to report the frequency of the emotion or behavior using a three-point scale (0 = not true or hardly ever true, 2 = very true or often true). The SCARED yields scores on five subscales (somatic problems, general anxiety, separation anxiety, social phobia, and school phobia), and the sum of all item responses yields a total anxiety score. A total anxiety score greater than or equal to 25 serves as a cutoff point for the diagnosis of an anxiety disorder [16].

Differences between baseline scores and scores obtained after 12 weeks of treatment were calculated to evaluate the clinical improvement. Values were computed to show higher differences in scale scores as higher improvement as follows: $GAF/CGAS = GAF/CGAS_{week 12} - GAF/CGAS_{week 0}$; $CGI = CGI_{week 0} - CGI_{week 12}$; $CDI = CDI_{week 0} - CDI_{week 12}$; $OCI-CV = OCI-CV_{week 0} - OCI-CV_{week 12}$; and $SCARED = SCARED_{week 0} - SCARED_{week 12}$. Clinical improvement was also assessed by the administration of the CGI-I after 12 weeks of fluoxetine treatment. It has to be noted in this case that high CGI-I scale scores indicate lower improvement.

As multiple improvement phenotypes were assessed, the score change in the GAF/CGAS scale was considered the primary outcome measure of the present study. All other scales were included in the secondary analysis carried out.

All procedures were approved by the hospital's Ethics Committee. Written informed consent was obtained from all parents and verbal informed consent was provided by all patients following an explanation of the procedures involved.

Sample preparation

Blood samples from participants were collected in EDTA (K2EDTA BD Vacutainer EDTA tubes; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) and genomic DNA was extracted using the MagNA Pure LC DNA isolation Kit III and an LC MagNA Pure system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The DNA concentration and quality were measured spectrophotometrically using a NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Surrey, UK).

Gene selection

We focused on selecting candidate genes related to the pharmacodynamics of fluoxetine. The selection criteria were based on clinical, experimental and/or pharmacogenetic evidence for the involvement of genes in different pathways directly or indirectly related to the fluoxetine and other antidepressant drugs response or related to the pathophysiology of major depression and other mood disorders. Different pathways or systems were studied by selecting several candidate genes for

Table 2 List of the 47 genes selected in the study

Genes	Function
Serotonergic system	
<i>MTHFR</i> (chr 1)	Homocysteine metabolism. Monoamine synthesis.
<i>TPH1</i> (chr 11)	Serotonin biosynthesis
<i>TPH2</i> (chr 12)	Serotonin biosynthesis
<i>MAOA</i> (chr X)	Monoamine neurotransmitters degradation
<i>SLC6A4</i> (chr 17)	Serotonin transporter
<i>HTR1A</i> (chr 5)	Presynaptic and postsynaptic serotonin receptor
<i>HTR1B</i> (chr 6)	Presynaptic serotonin receptor
<i>HTR2A</i> (chr 13)	Postsynaptic serotonin receptor
<i>HTR2C</i> (chr X)	Postsynaptic serotonin receptor
<i>HTR3A</i> (chr 11)	Postsynaptic serotonin receptor
Other neurotransmitter systems	
<i>CNR1</i> (chr 6)	Endocannabinoid receptor. Neurotransmission modulation.
<i>GRIK4</i> (chr 11)	Glutamate receptor
<i>ACE</i> (chr 17)	Modulation of dopamine and substance P turnover
<i>COMT</i> (chr 22)	Catecholamines degradation
<i>KCNK2</i> (chr 1)	Modulation of action potential and neurotransmitter release
<i>PPP1R1B</i> (chr 17)	Integration of different neurotransmitters signaling
<i>GNB3</i> (chr 12)	Transduction of different neurotransmitters signal
Hypothalamic-pituitary-adrenal axis	
<i>CRHR1</i> (chr 17)	Corticotropin-releasing hormone receptor
<i>CRHR2</i> (chr 7)	Corticotropin-releasing hormone receptor
<i>NR3C1</i> (chr 5)	Glucocorticoid receptor
<i>NR3C2</i> (chr 4)	Mineralocorticoids receptor
<i>FKBP5</i> (chr 6)	Regulation of glucocorticoid receptor affinity
<i>AVPR1B</i> (chr 1)	Stimulation of adrenocorticotropin hormone release
<i>CRHBP</i> (chr 5)	Inactivation of corticotropin-releasing hormone
<i>UCN3</i> (chr 10)	Ligand for corticotropin-releasing factor type 2 receptors
Neurodevelopment	
<i>NTRK2</i> (chr 9)	BDNF and neurotrophin 3 growth factor receptor
<i>BDNF</i> (chr 11)	Nerve growth factor
<i>CREB1</i> (chr 2)	Transcription factor important in BDNF signaling
<i>GSK3B</i> (chr 3)	Regulation of neurodevelopment
<i>DTNBP1</i> (chr 6)	Organization of actin cytoskeleton and neurite outgrowth
Inflammation pathway	
<i>NOS1</i> (chr 12)	Synthesis of nitric oxide, a proinflammatory agent
<i>PSMB4</i> (chr 1)	Peptides cleavage. Antigen processing in T-cells.
<i>IL1B</i> (chr 2)	Proinflammatory cytokine
<i>SERPINE1</i> (chr 7)	Inhibition of fibrinolysis
<i>STAT3</i> (chr 17)	Transduction of cytokines and growth factors signaling
<i>TGFB1</i> (chr 19)	Anti-inflammatory cytokine
<i>MIF</i> (chr 22)	Cell-mediated immunity and inflammation
Circadian rhythm	
<i>NPAS2</i> (chr 2)	Transcriptional regulation of circadian genes
<i>CLOCK</i> (chr 4)	Transcriptional regulation of circadian genes
<i>ARNTL</i> (chr 11)	Transcriptional regulation of circadian genes
<i>RORA</i> (chr 15)	Transcriptional regulation of circadian genes
<i>RORB</i> (chr 9)	Transcriptional regulation of circadian genes
<i>CRY2</i> (chr 11)	Inhibition of circadian genes transcription
<i>MTNR1A</i> (chr 4)	Melatonin receptor
<i>MTNR1B</i> (chr 11)	Melatonin receptor
Genome-wide association studies	
<i>EPHB1</i> (chr 3)	Ephrin receptor
<i>CDH17</i> (chr 8)	Intestinal proton-dependent peptide transportation

each of them. A total of 47 candidate genes were selected (Table 2).

Bioinformatic assessment of selected genes

To assess the selection of genes performed for the pharmacogenetic association study, we used different bioinformatic tools to analyze how each gene was related to fluoxetine within the protein interaction network of this drug.

First, we used EMBL's STITCH 4.0 database [17], which covers interactions between chemicals and proteins, to identify the known or predicted fluoxetine interaction network. After querying 'fluoxetine' and limiting the results to five genes with confidence values higher than 0.9, the following genes were identified: *SLC6A4*, *HTR2C*, *HTR2A*, *NR3C1*, and *CYP2D6*. The latter was not considered in the analysis as the present study only focused on the pharmacodynamics of fluoxetine. The four remaining genes were later used as 'seeds' to build a centered network that has at its core the first molecular interactors of fluoxetine, thus being very specific.

Second, the entire STRING database, v9.1 [18] and BioGRID database, v3.2.117 [19] were downloaded, and we used customized Perl scripts to retrieve and filter the human pairwise interactions of the four genes listed above. The resulting network is referred to as the first-level graph (because it only gathers the direct interactions of the seed genes) (Supplementary Fig. 1a, Supplemental digital content 1, <http://links.lww.com/FPC/B51>). By advancing using a multilevel network approach, the same script used the interactors found in the first level as seeds to look for their own interactors, thus generating and growing the second-level graph (Supplementary Fig. 1b, Supplemental digital content 1, <http://links.lww.com/FPC/B51>).

Finally, to assess the connectivity of the four fluoxetine interactors with the 47 genes included in the study, we carried out a shortest-path analysis using the Perl Graph: Directed module from Comprehensive Perl Archive Network to find the paths between each of the four fluoxetine interactors and each of the 47 genes selected in the study. Different path distances were found including distance 1 (direct interaction between genes), 2, 3, 4, and 5 (gene interaction includes 1, 2, 3, or 4 intermediate genes, respectively).

Single nucleotide polymorphism selection

A total of 381 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected in the 47 candidate gene regions (covering target loci and upstream and downstream regions) following one of three strategies: (a) previously reported genetic associations mainly with antidepressant drug treatment or with the risk of developing depression and other mood disorders; (b) tagging analysis (as implemented in Haploview 4.2; Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA) at an r^2 threshold of 0.8 to capture 98% of the most common HapMap phase II variants on the basis of CEU panel [minor allele frequency (MAF) > 0.1, range: 91–100% for individual genes]; and (c) suspected SNP functionality according to data published in the Ensembl (<http://www.ensembl.org>), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), and PupaSuite 3 (<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es/>) databases, with a validated MAF greater than 0.1 in the White population.

Genotyping

SNPs were genotyped by the MassArray assay using the Sequenom genotyping system (Sequenom, San Diego, California, USA) at the Santiago de Compostela Node of the Spanish National Genotyping Center (CeGen).

Some SNPs were excluded from the analysis either because they failed the genotyping quality control established by the CeGen ($N=33$), were monomorphic ($N=1$), were out of Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$; $N=18$), or showed MAF values less than 0.1 ($N=13$). Ultimately, 316 validated SNPs in 45 candidate gene regions were used for the pharmacogenetic association analysis (Supplementary Table, Supplemental digital content 2, <http://links.lww.com/FPC/B52>).

Statistical analysis

Sample size and statistical power calculations were performed with Quanto 1.2 software (University of Southern California, Los Angeles, California, USA). These calculations were based on allele frequencies from 1000 genomes population genetics data (<http://www.ensembl.org>). Given the sample size, mean \pm SD of scale scores and assuming a 5% level of significance, could detect the following mean changes (β_G) in the different scale scores with more than 80% statistical power for allele frequencies ranging from 0.5 to 0.1: 6.0–9.9 (GAF/CGAS); 0.49–0.81 (CGI-S); 0.51–0.85 (CGI-I); 3.4–5.7 (CDI); 2.9–4.8 (OCI-CV); and 5.6–9.3 (SCARED).

Data were analyzed using IBM SPSS statistics 20 (IBM Corp., Chicago, Illinois, USA). Mean \pm SD were computed for continuous variables. To identify variables associated with clinical improvement, Pearson's or Spearman's correlations, the Student's t -test, analysis of variance, the Mann-Whitney U , or the Kruskal-Wallis test were used according to the distribution and scales of the variables. Hardy-Weinberg equilibrium was analyzed for each SNP. To estimate the independent contribution of each SNP toward clinical improvement, general linear models were used. The analysis was adjusted for diagnosis and the corresponding basal score was obtained for each assessed scale. Mean differences and confidence intervals (CIs) between genotype groups were computed to estimate the effect size. The best model of inheritance, out of codominant, dominant, recessive, overdominant and additive models, was selected using the Akaike Information Criterion. Haplotype analysis was carried out for the genes associated in the individual SNP analysis. For these purposes, we used the SNPpass R package (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). To avoid false positive results we applied Bonferroni's correction for multiple testing (0.05/number of comparisons). In the primary analysis, we evaluated the effect of all validated SNPs ($N=316$) on clinical improvement assessed by score changes in the GAF/CGAS scale (316 comparisons: significant $P<0.00016$). In the secondary analysis, we evaluated the effect of SNPs involved in the serotonergic

pathway ($N=63$) on clinical improvement assessed by score changes in GAF/CGAS, CGI-S, CGI-I, CDI, OCI-CV, and SCARED scales (378 comparisons: significant $P < 0.00013$).

Results

Demographic and clinical data are shown in Table 1. The mean baseline score obtained in the scales was low for the GAF/CGAS and high for the CGI-S, CDI, OCI-CV, and SCARED, in accordance with the pathological condition of the patients. The mean fluoxetine dose administered was 25.2 ± 11.9 mg/day, with 20 and 40 mg/day being administered to the majority of patients. Some patients were temporarily comedicated with antipsychotics (15.6%), benzodiazepines (10.8%), or mood stabilizers (2.4%). Clinical improvement did not show significant differences between patients treated only with fluoxetine and those receiving comedication. Most patients were diagnosed with MDD (68.7%). Overall, 19.3 and 12.0% of patients were diagnosed with OCD and GAD, respectively. After 12 weeks of fluoxetine treatment, clinical improvement was observed in patients diagnosed with MDD, OCD, and GAD (data not shown). However, the improvement showed some significant differences among patients with different diagnoses (Supplementary Table, Supplemental digital content 3, <http://links.lww.com/FPC/B53>); thus, the genetic association analysis was adjusted accordingly. Moreover, we found significant correlations between baseline scores on the scales and clinical response (GAF/CGAS: $r = -0.59$, $P < 0.001$; CGI-S: $r = 0.60$, $P < 0.001$; CDI: $r = 0.37$, $P = 0.001$; OCI-CV: $r = 0.48$, $P < 0.001$; SCARED: $r = 0.41$, $P < 0.001$). This means that patients with worse baseline scores tended to have a better response; thus, the statistical analysis was also adjusted accordingly.

After an exhaustive literature search, we selected 47 candidate genes related to the pharmacodynamics of fluoxetine. The selected genes were involved in six different pathways or systems including the serotonergic and other neurotransmitter systems, the hypothalamic–pituitary–adrenal axis, the circadian rhythm, and inflammatory and neurodevelopmental pathways. Two other genes were also selected from genome-wide association results (Table 2). Then, to assess the gene selection performed, different bioinformatic tools were used to analyze how each gene was related to fluoxetine within a protein interaction network. The results of this analysis identified *SLC6A4*, *HTR2C*, *HTR2A*, and *NR3C1* as the main fluoxetine interactors. The protein networks constructed from these four genes identified 14 of the 47 selected genes (~30%) in the first-level graph (with 384 nodes and 965 interactions) (Supplementary Fig. 1a, Supplemental digital content 1, <http://links.lww.com/FPC/B51>). The second-level graph (with 13 521 nodes and 95 082 interactions), included 44 of the 47 selected genes (~94%) (Supplementary Fig. 1b, Supplemental digital content 1, <http://links.lww.com/FPC/B51>),

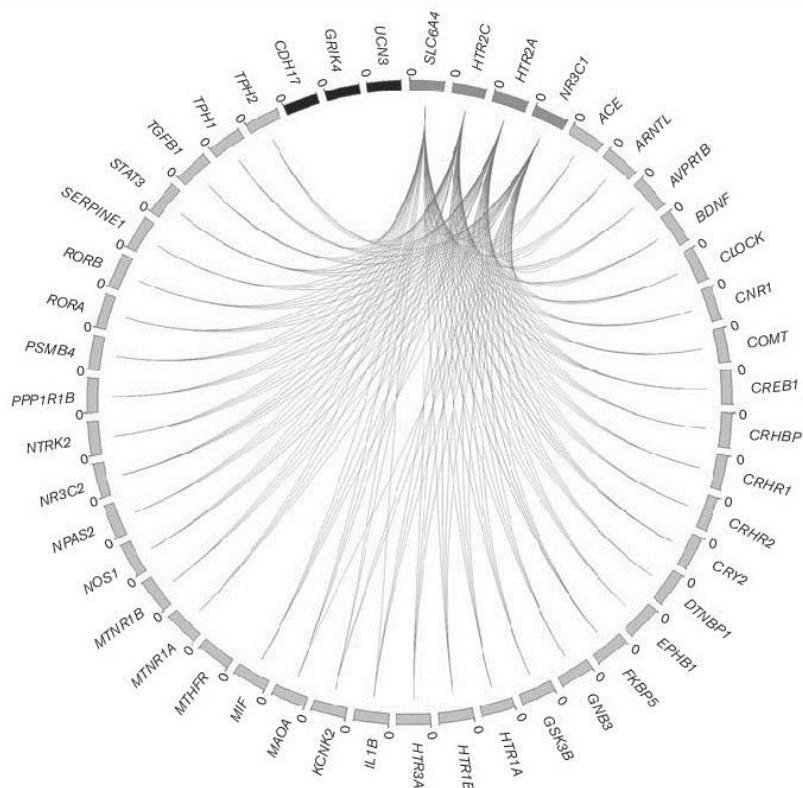
with only three genes missing (*CDH17*, *GRIK4*, and *UCN3*) (Fig. 1). The results of the shortest-path analysis showed that all selected genes found in the second network, other than the *MTHFR* gene, were linked with the four main fluoxetine interactors at a maximum distance of 3 (Fig. 1).

Given the large number of validated SNPs and clinical improvement phenotypes considered in the study, two statistical analyses were carried out to reduce the number of comparisons.

First, the score change in the GAF/CGAS scale was selected as the primary outcome measure for the genetic association analysis of the 316 validated polymorphisms (Supplementary Table, Supplemental digital content 4, <http://links.lww.com/FPC/B54>). The selection of this scale was made on the basis of a number of reasons. GAF/CGAS are applicable to a broad range of psychiatric diagnoses in children and adolescents, with their use well documented in these young populations [20,21]. Unlike CDI, OCI-CV, or SCARED, the GAF/CGAS is a Global Assessment Scale that is not focused on specific kinds of symptoms, and unlike CGI-S or CGI-I, the GAF/CGAS provides overall information not only about symptom severity but also about psychosocial functioning. The advantage of this global assessment over specific symptoms rating scales is that the whole state of the patient is evaluated and not just one particular symptom [21]. Moreover, GAF/CGAS was the scale that showed the strongest correlation with both the CGI-S and the CGI-I scales. This primary analysis showed a significant association between the 5-hydroxytryptamine receptor 1B (*HTR1B*) rs130058 polymorphism and clinical improvement after treatment with fluoxetine in our pediatric population (Fig. 2). As expected, both homozygous and heterozygous patients for this polymorphism experienced clinical improvement after 12 weeks of fluoxetine treatment, as indicated by increases in the GAF/CGAS scale scores (mean \pm SE): 20.8 ± 2.0 and 12.7 ± 2.3 , respectively. However, heterozygous patients showed lower score increases (difference = -8.6 ; CI = -12.6 – -4.5 ; $P = 0.00009$, significant after Bonferroni's correction) and, therefore, lower clinical improvement than homozygous patients (Fig. 3a).

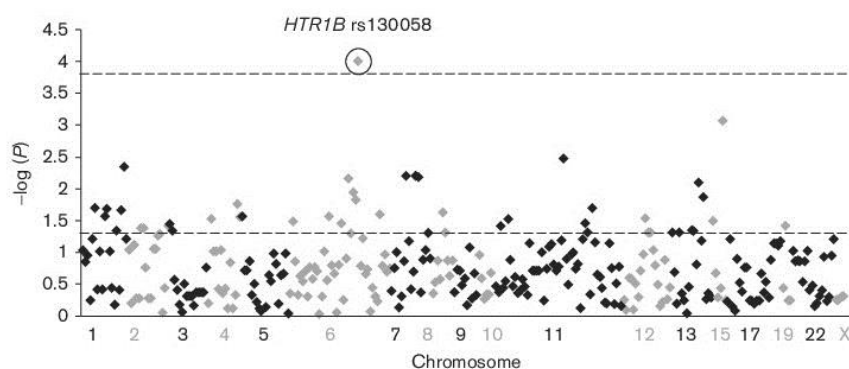
Given the results obtained in the primary analysis, the SNPs located in genes related to the serotonergic system ($N=63$; Supplementary Table, Supplemental digital content 2, <http://links.lww.com/FPC/B52>) were included in the secondary analysis, in which clinical improvement was assessed by CGI-I scale scores and by score changes in GAF/CGAS, CGI-S, CDI, OCI-CV, and SCARED. The results of this secondary analysis showed another significant association between the tryptophan 5-hydroxylase 2 (*TPH2*) rs4570625 polymorphism and clinical improvement. Also, in this case, both genotype groups considered for this polymorphism, major allele carriers

Fig. 1



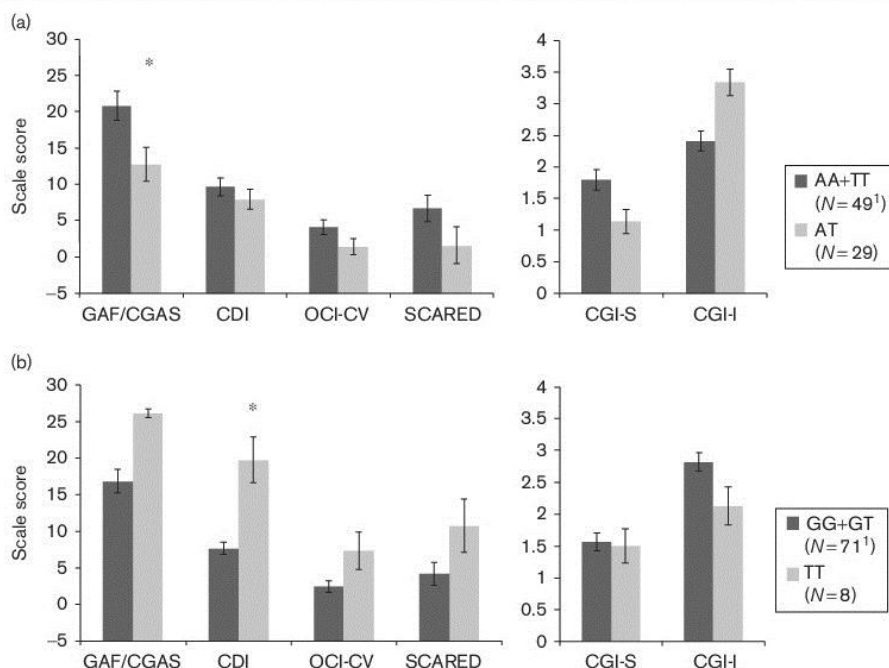
Connectivity between the 47 genes selected in the study. Dark grey genes correspond to the main fluoxetine interactors. Light grey or black genes are those found or missing, respectively, in the fluoxetine protein network at the second level. Grey lines represent the shortest path with a maximum distance of 3 between selected genes and the main fluoxetine interactors.

Fig. 2



Primary genetic association analysis between the 316 validated SNPs and clinical improvement assessed by the GAF/CGAS scales. The *x*-axis shows SNPs ordered by chromosome position. The *y*-axis indicates $-\log$ of the likelihood ratio tests computed for 316 valid SNPs, adjusting the analysis for diagnosis and the corresponding basal scale score. The horizontal lines at $-\log(P)$ 1.3 and 3.8 correspond to a nominal *P*-value of 0.05 and a Bonferroni's *P*-value of 0.00016, respectively. GAF/CGAS, Global Assessment of Functioning/Children's Global Assessment Scale; SNP, single nucleotide polymorphism.

Fig. 3



Effect of *HTR1B* rs130058 (a) and *TPH2* rs4570625 (b) on clinical improvement measured by differences in scores obtained in all scales after fluoxetine treatment. Scale scores show increases in the GAF/CGAS, decreases in the CDI, OCI-CV, SCARED, and CGI-S, and the CGI-I scales. Higher scale scores indicate higher improvement, except for the CGI-I scale, in which lower scores indicate higher improvement. The analysis was adjusted for diagnosis and the corresponding basal score obtained for each assessed scale. Results are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.00013$, significant after Bonferroni's correction. [†]One less patient for the CDI, OCI-CV, and SCARED scales. CDI, Children's Depression Inventory; CGI-I, Clinical Global Impression-Improvement; CGI-S, Clinical Global Impression-Severity; GAF/CGAS, Global Assessment of Functioning/Children's Global Assessment Scale; OCI-CV, Obsessive-Compulsive Inventory-Child Version; SCARED, Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders.

(GT and TT) and minor allele homozygotes (TT), experienced clinical improvement after 12 weeks of fluoxetine treatment, as indicated by decreases in the CDI scale scores (mean \pm SE): 7.7 ± 0.8 and 19.7 ± 3.1 , respectively. However, minor allele homozygotes showed higher score reductions (difference = 11.5; CI = 6.5–16.5; $P = 0.00002$, significant after Bonferroni's correction) (Fig. 3b). According to the results of the primary analysis, heterozygous patients for the *HTR1B* rs130058 polymorphism showed lower improvement on all the other scales assessed. In particular, they showed higher CGI-I scale scores ($P = 0.0003$) and lower reductions in scores on the CGI-S ($P = 0.0009$), CDI ($P = 0.04$), OCI-CV ($P = 0.002$), and SCARED ($P = 0.005$) (Fig. 3a). However, these differences were not significant after Bonferroni's correction ($P > 0.00013$).

Discussion

Although a wide range of candidate genes related to different pathways were assessed, the results of this study indicate the influence of genetic variations in the serotonergic system on clinical improvement after

fluoxetine treatment in children and adolescents patients. In particular, after Bonferroni's correction, *HTR1B* rs130058 and *TPH2* rs4570625 polymorphisms were associated significantly with clinical improvement.

HTR1B encodes the 5-hydroxytryptamine receptor 1B, an autoreceptor that is related to serotonin release. This receptor plays a role in the pathogenesis of MDD as well as in the antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors [22]. *HTR1B* knockout mice show a variety of interesting behavioral changes such as decreased anxiety or increased impulsivity [23] and some of the effects of these antidepressant drugs are lacking in these animals [24]. Genetic variants in this gene have been associated with antidepressant response and certain behavioral traits after antidepressant treatment [25,26]. One of these variants, rs130058, was associated with clinical improvement in our study. This polymorphism is located in the promoter region and modifies the transcriptional activity in different cell lines [27] including human cortical neurons [28]. We found that heterozygous patients showed a reduced improvement in the global

functioning, measured using the GAF/CGAS scale. The effect of the polymorphism observed in heterozygotes could be because of differences in linkage disequilibrium between the two alleles and other functional polymorphisms that also modify the expression of *HTR1B*. In fact, there is another functional variant, rs11568817, in the 5'-UTR in close proximity (100 bp) to rs130058, which seems to exert an opposing effect on gene expression *in vitro* [28]. In the present study, *HTR1B* rs11568817 heterozygotes also showed lower clinical improvement (OCI: $P=0.001$; SCARED: $P=0.01$; CGI-I: $P=0.0005$), but the results did not survive Bonferroni's correction. Although it is not common to observe particular traits in heterozygotes, this was also reported previously for the rs11568817 and the presence of certain behavioral traits [29]. As the haplotype analysis did not show any other more significant results, the combined effects of these and other functional polymorphisms in *HTR1B* may only be detectable in heterozygotes, which would explain the results found here.

TPH catalyzes the rate-limiting step in serotonin biosynthesis. There are two isoforms: TPH1 and TPH2, but the latter seems to be more selectively expressed in the brain system [30]. Consequently, *TPH2* is an important candidate gene in the pharmacogenetics of antidepressant response [31]. Long-term treatment with fluoxetine was found to be associated with up-regulation of TPH2 mRNA expression, which seems to occur simultaneously with the antidepressant effect [32]. In our study, we found that the *TPH2* rs4570625 genetic variant was associated with clinical improvement after fluoxetine treatment. In particular, minor allele homozygotes (TT) showed a higher reduction in depressive symptoms assessed by the CDI scale. This polymorphism is located in the promoter region of the *TPH2* gene and seems to have an important biological function. Although further research is needed to clarify the real impact of this polymorphism on *TPH2* expression in the brain and serotonin synthesis, it has been reported that a haplotype containing the rs4570625 allele T could reduce gene expression in cell culture [33]. Moreover, smaller volumes have been found in the bilateral amygdala and hippocampus in allele T carriers of this variant [34]. Interestingly, the results of a meta-analysis, in which more than 70 SNPs in *TPH2* were considered, showed that rs4570625 allele T was associated with major depression [35]. Moreover, this polymorphism seems to play a significant role in the pathogenesis of other related psychiatric disorders including panic disorder [36] and poststroke anxiety disorder [37]. In terms of antidepressant treatment, this genetic variant, in combination with another in the serotonin transporter gene, has recently been associated with citalopram response in children and adolescent patients [38]. Moreover, other *TPH2* polymorphisms, which are in linkage

disequilibrium with rs4570625, have also been implicated in fluoxetine response [39,40].

In terms of the specificity of these associations, it is important to note that although significant differences after Bonferroni's correction were detected only for particular scales, the same pattern in score changes for almost all the clinical scales was observed in the genotype groups of both SNPs. These score changes even showed nominal P -values in the *HTR1B* rs130058 analysis.

Previous data from our group showed the effect of genetic variants related to the pharmacokinetics of fluoxetine on clinical improvement [8]. In particular, although polymorphisms in *CYP2D6* only had an effect on the plasma fluoxetine/norfluoxetine ratio, a genetic variant in *ABCB1*, which encodes the membrane transporter P-glycoprotein, was associated with clinical response. In the present study, we focused on searching for genetic markers related to the pharmacodynamics of fluoxetine. An exhaustive search of candidate genes was performed to include different pathways with a direct or an indirect relationship with the mechanism of action of antidepressants. Forty-seven genes participating in six different pathways were selected. The selection of candidate genes was reinforced by the bioinformatics analysis, which found identified the vast majority of the selected genes that showed high connectivity between them in the fluoxetine interaction network that was constructed. However, other genes not studied here could have also influenced the fluoxetine response. The bioinformatics approach used in this study could be a useful tool for selecting new candidate genes. By constructing first-level and second-level graphs (or even more) from a few key 'seed' genes, many other genes or proteins in the same pathway/shortest path can be detected in the network. Then, by applying specific filters, it will be possible to obtain a reduced final network that will include new interesting candidate genes. For the SNP selection, it should be noted that important genetic variants that were not included in the present study because of our selection criteria might also play a role in the antidepressant response. These include *SLC6A4* indel and rs25531, which also affect the expression of the serotonin transporter [41–43].

It is important to highlight the homogeneity of our cohort in terms of age as all participants were children and adolescents and because all patients were receiving antidepressant treatment for the first time, with fluoxetine being the only antidepressant administered during the same period of time. However, the present study has some limitations. The main one was the small sample size, taking into account the increased number of polymorphisms analyzed. However, we consider that an adequate type I error rate control was provided. The most conservative correction was applied using Bonferroni's by taking into account all polymorphisms independently.

However, many of them are in linkage disequilibrium. Moreover, genes were selected on the basis of previously reported associations; thus, hypothesis-driven analyses were carried out. Moreover, to reduce the number of comparisons, primary and secondary analyses were carried out. Although diagnostic variability was controlled as a covariate in the statistical analysis, it has to be considered another limitation of the present study. It is well known that the treatment time required for observing clinical improvement is different among the three diagnoses, with the time being longer for OCD patients. Clinical trials in children and adolescents with OCD have shown that at least 7 weeks of fluoxetine treatment are needed to reduce the pathological symptoms [44]. In the present study, although patients diagnosed with MDD, OCD, and GAD experienced clinical improvement after 12 weeks of fluoxetine treatment, differences among diagnoses were detected. Moreover, the fact that some patients could have received comedication at some point of the study could have somehow affected their clinical improvement, even though no differences were detected. It should also be noted that the small sample size of our cohort could limit the association of other genetic variants that could have smaller effects on clinical response. Other studies with larger cohorts would be needed to identify such variants and to assess the effect of their combined genotypes. Therefore, relevant genetic markers together with important clinical features, such as initial symptoms' severity and diagnosis, should be included in clinical predictors of the antidepressant response, thereby enabling clinicians to personalize and improve the treatment of children and adolescent patients.

Conclusion

Genetic variants in *HTR1B* and *TPH2* were associated with clinical improvement in children and adolescent patients treated with fluoxetine. Although a wide range of candidate genes related to different pathways were assessed, the results show that genetic markers directly related to serotonin exert an important effect on fluoxetine response. As other genetic markers, such as those involved in the bioavailability of fluoxetine in the brain, also seem to be relevant, other genetic studies with larger cohorts will be needed to assess the effect of combined genotypes to find genetic predictors of the antidepressant response.

Acknowledgements

The authors thank the Language Advisory Service at the University of Barcelona for manuscript revision. The authors also thank all patients and their families for the time and effort spent on this study.

This work was supported by the Alicia Koplowitz Foundation; the Spanish Ministry of Health, Instituto Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS)

(PI041239); and FEDER-Unión Europea. Support was also provided by the 'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i Recerca' (AGAUR) of the 'Generalitat de Catalunya' to the 'Child Psychiatry and Psychology Group' (2014 SGR 489) and the 'Clinical Pharmacology and Pharmacogenetics Group' (2014 SGR 436).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

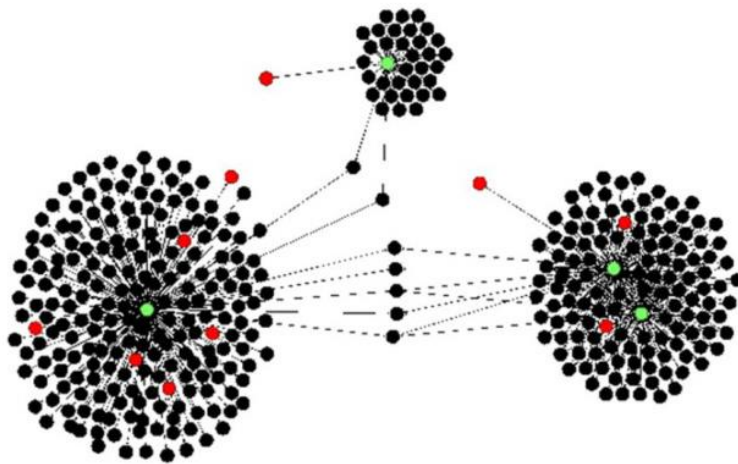
References

- 1 Wilens TE, Cohen L, Biederman J, Abrams A, Neft D, Faid N, Sinha V. Fluoxetine pharmacokinetics in pediatric patients. *J Clin Psychopharmacol* 2002; **22**:568–575.
- 2 Usala T, Clavenna A, Zuddas A, Bonati M. Randomised controlled trials of selective serotonin reuptake inhibitors in treating depression in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008; **18**:62–73.
- 3 Keeton CP, Kolos AC, Walkup JT. Pediatric generalized anxiety disorder: epidemiology, diagnosis, and management. *Paediatr Drugs* 2009; **11**:171–183.
- 4 Franchini L, Serretti A, Gasperini M, Smeraldi E. Familial concordance of fluvoxamine response as a tool for differentiating mood disorder pedigrees. *J Psychiatr Res* 1998; **32**:255–259.
- 5 Jia P, Wang L, Meltzer HY, Zhao Z. Pathway-based analysis of GWAS datasets: effective but caution required. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011; **14**:567–572.
- 6 Fabbri C, di Girolamo G, Serretti A. Pharmacogenetics of antidepressant drugs: an update after almost 20 years of research. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2013; **162B**:487–520.
- 7 Blázquez A, Mas S, Plana MT, Lafuente A, Lázaro L. Fluoxetine pharmacogenetics in child and adult populations. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2012; **21**:599–610.
- 8 Gassó P, Rodríguez N, Mas S, Pagerols M, Blázquez A, Plana MT, *et al.* Effect of CYP2D6, CYP2C9 and ABCB1 genotypes on fluoxetine plasma concentrations and clinical improvement in children and adolescent patients. *Pharmacogenomics J* 2014; **14**:457–462.
- 9 Blázquez A, Mas S, Plana MT, Gassó P, Méndez I, Torra M, *et al.* Plasma fluoxetine concentrations and clinical improvement in an adolescent sample diagnosed with major depressive disorder, obsessive-compulsive disorder, or generalized anxiety disorder. *J Clin Psychopharmacol* 2014; **34**:318–326.
- 10 American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press; 1994.
- 11 Luborsky L. Clinician's judgments of mental health: a proposed scale. *Arch Gen Psychiatry* 1962; **7**:407–417.
- 12 Shaffer D, Gould MS, Brasic J, Ambrosini P, Fisher P, Bird H, Aluwahlia S. A children's global assessment scale (CGAS). *Arch Gen Psychiatry* 1983; **40**:1228–1231.
- 13 Guy W. *ECDEU assessment manual for psychopharmacology, revised*. Bethesda, MD: United States Department of Health, Education, and Welfare; 1976.
- 14 Kovacs M. *Children's depression inventory manual*. New York, NY: Multi-Health Systems; 1992.
- 15 Foa EB, Coles M, Huppert JD, Pasupuleti RV, Franklin ME, March J. Development and validation of a child version of the obsessive-compulsive inventory. *Behav Ther* 2010; **41**:121–132.
- 16 Birmaher B, Khetarpal S, Brent D, Cully M, Balach L, Kaufman J, Neer SM. The Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED): scale construction and psychometric characteristics. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1997; **36**:545–553.
- 17 Kuhn M, Szklarczyk D, Pletscher-Frankild S, Blicher TH, von Mering C, Jensen LJ, Bork P. STITCH 4: integration of protein-chemical interactions with user data. *Nucleic Acids Res* 2014; **42** (Database issue):D401–D407.
- 18 Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, *et al.* STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res* 2013; **41** (Database issue):D808–D815.
- 19 Chatr-Aryamontri A, Breitkreutz BJ, Oughtred R, Boucher L, Heinicke S, Chen D, *et al.* The BioGRID interaction database: 2015 update. *Nucleic Acids Res* 2015; **43** (Database issue):D470–D478.
- 20 Manassis K, Hood J. Individual and familial predictors of impairment in childhood anxiety disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1998; **37**:428–434.

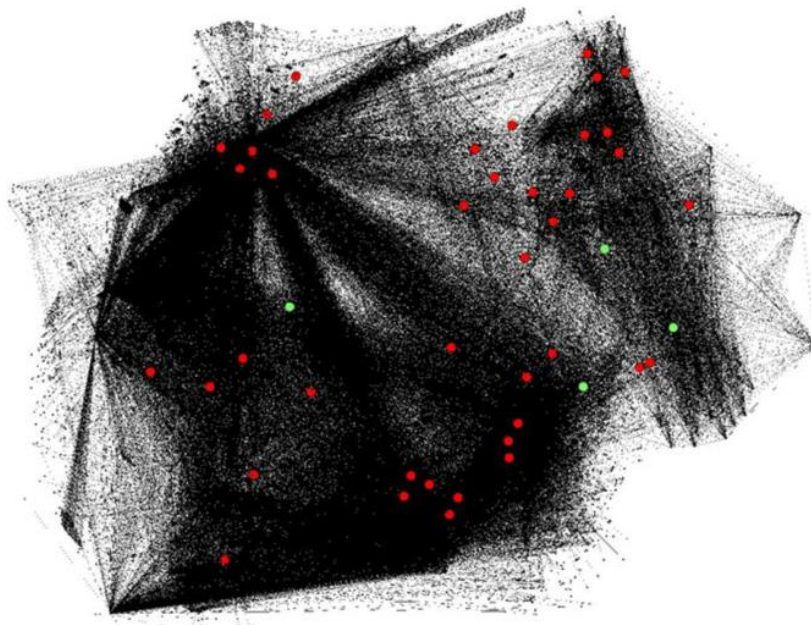
- 21 Schorre BE, Vandvik IH. Global assessment of psychosocial functioning in child and adolescent psychiatry. A review of three unidimensional scales (CGAS, GAF, GAFD). *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2004; **13**:273–286.
- 22 Tsai SJ, Hong CJ, Yu YW, Chen TJ, Wang YC, Lin WK. Association study of serotonin 1B receptor (A-161 T) genetic polymorphism and suicidal behaviors and response to fluoxetine in major depressive disorder. *Neuropsychobiology* 2004; **50**:235–238.
- 23 Sanders AR, Duan J, Gejman PV. DNA variation and psychopharmacology of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. *Pharmacogenomics* 2002; **3**:745–762.
- 24 Lotrich FE, Pollock BG. Candidate genes for antidepressant response to selective serotonin reuptake inhibitors. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2005; **1**:17–35.
- 25 Perroud N, Bondolfi G, Uher R, Gex-Fabry M, Aubry JM, Bertschy G, et al. Clinical and genetic correlates of suicidal ideation during antidepressant treatment in a depressed outpatient sample. *Pharmacogenomics* 2011; **12**:365–377.
- 26 Lenze EJ, Dixon D, Nowotny P, Lotrich FE, Doré PM, Pollock BG, et al. Escitalopram reduces attentional performance in anxious older adults with high-expression genetic variants at serotonin 2A and 1B receptors. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013; **16**:279–288.
- 27 Sun HF, Chang YT, Fann CS, Chang CJ, Chen YH, Hsu YP, et al. Association study of novel human serotonin 5-HT(1B) polymorphisms with alcohol dependence in Taiwanese Han. *Biol Psychiatry* 2002; **51**:896–901.
- 28 Duan J, Sanders AR, Molen JE, Martinovich L, Mowry BJ, Levinson DF, et al. Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression. *Mol Psychiatry* 2003; **8**:901–910.
- 29 Moul C, Dobson-Stone C, Brennan J, Hawes D, Dadds M. An exploration of the serotonin system in antisocial boys with high levels of callous-unemotional traits. *PLoS One* 2013; **8**:e56619.
- 30 Zill P, Büttner A, Eisenmenger W, Möller HJ, Ackenheil M, Bondy B. Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study. *J Psychiatr Res* 2007; **41**:168–173.
- 31 Porcelli S, Drago A, Fabbri C, Gibiino S, Calati R, Serretti A. Pharmacogenetics of antidepressant response. *J Psychiatry Neurosci* 2011; **36**:87–113.
- 32 Shishkina GT, Kalinina TS, Dygalo NN. Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect. *Neuroscience* 2007; **150**:404–412.
- 33 Chen GL, Vallender EJ, Miller GM. Functional characterization of the human TPH2 5' regulatory region: untranslated region and polymorphisms modulate gene expression in vitro. *Hum Genet* 2008; **122**:645–657.
- 34 Inoue H, Yamasue H, Tochigi M, Takei K, Suga M, Abe O, et al. Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on amygdalar and hippocampal volumes. *Brain Res* 2010; **1331**:51–57.
- 35 Gao J, Pan Z, Jiao Z, Li F, Zhao G, Wei Q, et al. TPH2 gene polymorphisms and major depression – a meta-analysis. *PLoS One* 2012; **7**:e36721.
- 36 Kim YK, Lee HJ, Yang JC, Hwang JA, Yoon HK. A tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphism is associated with panic disorder. *Behav Genet* 2009; **39**:170–175.
- 37 Chi S, Teng L, Song JH, Zhou C, Pan WH, Zhao RL, Zhang C. Tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms and poststroke anxiety disorders. *J Affect Disord* 2013; **144**:179–182.
- 38 Rotberg B, Kronenberg S, Carmel M, Frisch A, Brent D, Zalsman G, et al. Additive effects of 5-HTTLPR (serotonin transporter) and tryptophan hydroxylase 2G-703T gene polymorphisms on the clinical response to citalopram among children and adolescents with depression and anxiety disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2013; **23**:117–122.
- 39 Peters EJ, Slager SL, McGrath PJ, Knowles JA, Hamilton SP. Investigation of serotonin-related genes in antidepressant response. *Mol Psychiatry* 2004; **9**:879–889.
- 40 Tsai SJ, Hong CJ, Liou YJ, Yu YW, Chen TJ, Hou SJ, Yen FC. Tryptophan hydroxylase 2 gene is associated with major depression and antidepressant treatment response. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; **33**:637–641.
- 41 Kraft JB, Slager SL, McGrath PJ, Hamilton SP. Sequence analysis of the serotonin transporter and associations with antidepressant response. *Biol Psychiatry* 2005; **58**:374–381.
- 42 Porcelli S, Fabbri C, Serretti A. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with antidepressant efficacy. *Eur Neuropsychopharmacol* 2012; **22**:239–258.
- 43 Mrazek DA, Rush AJ, Biernacka JM, O'Kane DJ, Cunningham JM, Wieben ED, et al. SLC6A4 variation and citalopram response. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009; **150B**:341–351.
- 44 Geller DA, Hoog SL, Heiligenstein JH, Ricardi RK, Tamura R, Kluszynski S, Jacobson JG. Fluoxetine Pediatric OCD Study Team. Fluoxetine treatment for obsessive-compulsive disorder in children and adolescents: a placebo-controlled clinical trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2001; **40**:773–779.

Supplemental Digital Content 1: First (A) and second (B) level graph of the fluoxetine protein network. Colored circles correspond to genes selected in the study (A: N = 14; B: N = 44). Green circles correspond to the four main fluoxetine interactors (*SLC6A4*, *HTR2C*, *HTR2A*, *NR3C1*).

a



b



Supplemental Digital Content 2. List of the 316 validated SNPs included in the study

Chr	Gene	SNP	Chr position ^a	Alleles ^b	MAF	Gene position
1	<i>AVPR1B</i>	rs28750713	206218943	C/T	0.127	Intronic region
1	<i>AVPR1B</i>	rs33985287	206231259	T/C	0.134	3'UTR region
1	<i>KCNK2</i>	rs12031300	215171545	G/A	0.223	Intergenic region
1	<i>KCNK2</i>	rs2841616	215173838	A/G	0.488	Intergenic region
1	<i>KCNK2</i>	rs10864143	215200303	T/A	0.319	Intronic region
1	<i>KCNK2</i>	rs2841575	215212242	C/T	0.488	Intronic region
1	<i>KCNK2</i>	rs10494991	215220599	T/C	0.422	Intronic region
1	<i>KCNK2</i>	rs12028008	215231546	A/G	0.47	Intronic region
1	<i>KCNK2</i>	rs12136349	215251227	G/A	0.277	Intronic region
1	<i>KCNK2</i>	rs6688713	215253603	G/A	0.259	Intronic region
1	<i>KCNK2</i>	rs12133857	215264486	G/T	0.127	Intronic region
1	<i>KCNK2</i>	rs11120499	215298808	G/T	0.404	Intronic region
1	<i>KCNK2</i>	rs12567520	215329267	G/A	0.139	Intronic region
1	<i>KCNK2</i>	rs10494994	215362207	G/A	0.241	Intronic region
1	<i>KCNK2</i>	rs11120519	215387063	C/A	0.464	Intronic region
1	<i>KCNK2</i>	rs12143625	215391840	T/C	0.229	Intronic region
1	<i>MTHFR</i>	rs1801131	11854476	A/C	0.277	Missense variant
1	<i>MTHFR</i>	rs1801133	11856378	C/T	0.398	Missense variant
1	<i>PSMB4</i>	rs4603	151374025	T/C	0.139	Missense variant
2	<i>CREB1</i>	rs2551639	208396187	A/G	0.187	Intronic region
2	<i>CREB1</i>	rs889895	208398929	T/C	0.187	Intronic region
2	<i>CREB1</i>	rs10932201	208426257	A/G	0.500	Intronic region
2	<i>CREB1</i>	rs6740584	208429351	C/T	0.500	Intronic region
2	<i>CREB1</i>	rs7569963	208473184	G/A	0.237	Intronic region
2	<i>CREB1</i>	rs2952768	208494234	T/C	0.327	Upstream region
2	<i>CREB1</i>	rs4675690	208507807	C/T	0.458	Intergenic region
2	<i>IL1B</i>	rs4849124	113576902	G/A	0.295	Intergenic region
2	<i>IL1B</i>	rs3917368	113582782	G/A	0.367	Downstream region
2	<i>IL1B</i>	rs1143643	113588302	G/A	0.367	Intronic region
2	<i>IL1B</i>	rs1143634	113590390	C/T	0.217	Synonymous variant
2	<i>IL1B</i>	rs1143627	113594387	T/C	0.307	5'UTR region
2	<i>IL1B</i>	rs16944	113594867	G/A	0.307	Upstream region
2	<i>NPAS2</i>	rs17025005	101553614	C/T	0.217	Intronic region
2	<i>NPAS2</i>	rs2305160	101591304	C/T	0.337	Missense variant
2	<i>NPAS2</i>	rs11541353	101594191	G/A	0.241	Missense variant
2	<i>NPAS2</i>	rs11123857	101603812	A/G	0.367	Intronic region
3	<i>EPHB1</i>	rs1980139	134509337	T/G	0.151	Intronic region
3	<i>EPHB1</i>	rs17763226	134510196	G/C	0.151	Intronic region
3	<i>EPHB1</i>	rs68091188	134511054	T/C	0.163	Intronic region
3	<i>EPHB1</i>	rs3182239	134978236	T/C	0.108	3'UTR region
3	<i>EPHB1</i>	rs66963301	134981687	C/T	0.367	Downstream region
3	<i>EPHB1</i>	rs34338595	134982109	G/A	0.367	Downstream region
3	<i>EPHB1</i>	rs9877871	134982757	A/G	0.367	Downstream region
3	<i>EPHB1</i>	rs10935157	134983377	C/A	0.367	Downstream region
3	<i>EPHB1</i>	rs1502174	135269091	T/C	0.446	Intergenic region
3	<i>GSK3B</i>	rs4261913	119546197	T/C	0.446	Intronic region

3	<i>GSK3B</i>	rs6782799	119610793	C/T	0.452	Intronic region
3	<i>GSK3B</i>	rs7617372	119619330	A/G	0.289	Intronic region
3	<i>GSK3B</i>	rs9856817	119625419	G/A	0.253	Intronic region
3	<i>GSK3B</i>	rs6774210	119680742	T/A	0.289	Intronic region
3	<i>GSK3B</i>	rs4688054	119733710	T/C	0.163	Intronic region
3	<i>GSK3B</i>	rs17811061	119821242	T/C	0.205	Intronic region
4	<i>CLOCK</i>	rs3749474	56300685	C/T	0.349	3'UTR region
4	<i>CLOCK</i>	rs1801260	56301369	T/C	0.289	3'UTR region
4	<i>CLOCK</i>	rs3736544	56309992	G/A	0.361	Synonymous variant
4	<i>CLOCK</i>	rs4580704	56326707	C/G	0.361	Intronic region
4	<i>CLOCK</i>	rs11133391	56367955	T/C	0.337	Intronic region
4	<i>MTNRIA</i>	rs4862705	187445552	G/A	0.271	Intergenic region
4	<i>MTNRIA</i>	rs6553010	187456343	G/A	0.139	Intronic region
4	<i>MTNRIA</i>	rs2165666	187461706	T/C	0.247	Intronic region
4	<i>MTNRIA</i>	rs13140444	187465729	T/C	0.313	Intronic region
4	<i>MTNRIA</i>	rs2119882	187476905	C/T	0.331	Upstream region
4	<i>MTNRIA</i>	rs7687823	187482867	G/A	0.287	Intergenic region
4	<i>NR3C2</i>	rs11099680	149103246	A/G	0.313	Intronic region
4	<i>NR3C2</i>	rs2070951	149358014	G/C	0.464	5'UTR region
4	<i>NR3C2</i>	rs9992256	149366293	A/G	0.453	Upstream region
5	<i>CRHBP</i>	rs1715751	76239704	A/G	0.410	Intergenic region
5	<i>CRHBP</i>	rs3811939	76250587	G/A	0.337	Intronic region
5	<i>CRHBP</i>	rs7728378	76259350	T/C	0.307	Intronic region
5	<i>CRHBP</i>	rs10055255	76263993	A/T	0.319	Intronic region
5	<i>CRHBP</i>	rs10062367	76264354	G/A	0.133	Intronic region
5	<i>CRHBP</i>	rs1875999	76264982	A/G	0.307	3'UTR region
5	<i>CRHBP</i>	rs1715747	76274537	A/G	0.337	Intergenic region
5	<i>HTRIA</i>	rs1364043	63250851	T/G	0.241	Intergenic region
5	<i>HTRIA</i>	rs878567	63255991	C/T	0.476	Downstream region
5	<i>HTRIA</i>	rs6295	63258565	C/G	0.476	Upstream region
5	<i>HTRIA</i>	rs10042486	63261329	T/C	0.470	Upstream region
5	<i>NR3C1</i>	rs6198	142657621	A/G	0.169	3'UTR region
5	<i>NR3C1</i>	rs10482682	142679397	G/A	0.355	Intronic region
5	<i>NR3C1</i>	rs852977	142687494	A/G	0.337	Intronic region
5	<i>NR3C1</i>	rs17100236	142720726	T/C	0.181	Intronic region
5	<i>NR3C1</i>	rs4912650	142723937	T/G	0.199	Intronic region
5	<i>NR3C1</i>	rs10482633	142750533	A/C	0.169	Intronic region
5	<i>NR3C1</i>	rs41423247	142778575	G/C	0.355	Intronic region
5	<i>NR3C1</i>	rs10052957	142786701	G/A	0.337	Intronic region
5	<i>NR3C1</i>	rs12655166	142809272	T/C	0.325	Intronic region
6	<i>CNR1</i>	rs7766029	88847435	C/T	0.500	Downstream region
6	<i>CNR1</i>	rs806366	88847589	C/T	0.422	Downstream region
6	<i>CNR1</i>	rs806367	88848416	C/T	0.367	Downstream region
6	<i>CNR1</i>	rs806368	88850100	T/C	0.193	3'UTR region
6	<i>CNR1</i>	rs1049353	88853635	G/A	0.193	synonymous variant
6	<i>CNR1</i>	rs806371	88856363	T/G	0.133	Intronic region
6	<i>CNR1</i>	rs806377	88858723	C/T	0.446	Intronic region
6	<i>CNR1</i>	rs2023239	88860482	T/C	0.199	Intronic region
6	<i>CNR1</i>	rs1535255	88861208	T/G	0.195	Intronic region

6	<i>CNR1</i>	rs6454674	88872930	T/G	0.331	Intronic region
6	<i>CNR1</i>	rs2180619	88877952	A/G	0.38	Upstream region
6	<i>DTNBP1</i>	rs2235258	15513482	T/C	0.265	Synonymous variant
6	<i>DTNBP1</i>	rs9396591	15516285	G/A	0.253	Intronic region
6	<i>DTNBP1</i>	rs1047631	15523101	A/G	0.139	3'UTR region
6	<i>DTNBP1</i>	rs4712253	15526417	C/T	0.422	Intronic region
6	<i>DTNBP1</i>	rs7762368	15528249	G/A	0.181	Intronic region
6	<i>DTNBP1</i>	rs9370823	15550658	A/G	0.253	Intronic region
6	<i>DTNBP1</i>	rs4498340	15557207	A/G	0.416	Intronic region
6	<i>DTNBP1</i>	rs3213207	15628102	A/G	0.114	Intronic region
6	<i>DTNBP1</i>	rs2005976	15650802	G/A	0.205	Intronic region
6	<i>DTNBP1</i>	rs760761	15651132	C/T	0.229	Intronic region
6	<i>DTNBP1</i>	rs2619522	15653649	T/G	0.205	Intronic region
6	<i>DTNBP1</i>	rs1018381	15657070	C/T	0.114	Intronic region
6	<i>DTNBP1</i>	rs1997679	15658905	C/T	0.337	Intronic region
6	<i>DTNBP1</i>	rs2619538	15665209	T/A	0.464	Upstream region
6	<i>FKBP5</i>	rs3800373	35542476	T/G	0.361	3'UTR region
6	<i>FKBP5</i>	rs7757037	35548236	G/A	0.404	Intronic region
6	<i>FKBP5</i>	rs992105	35555183	A/C	0.229	Intronic region
6	<i>FKBP5</i>	rs9296158	35567082	G/A	0.367	Intronic region
6	<i>FKBP5</i>	rs1360780	35607571	C/T	0.366	Intronic region
6	<i>FKBP5</i>	rs4713902	35614026	T/C	0.235	Intronic region
6	<i>FKBP5</i>	rs9470080	35646435	C/T	0.386	Intronic region
6	<i>FKBP5</i>	rs4713916	35669983	G/A	0.307	Intronic region
6	<i>HTR1B</i>	rs10943458	78161588	C/T	0.12	Intergenic region
6	<i>HTR1B</i>	rs9352481	78162536	G/A	0.494	Intergenic region
6	<i>HTR1B</i>	rs9359271	78166120	A/C	0.205	Intergenic region
6	<i>HTR1B</i>	rs2000292	78166945	G/A	0.247	Downstream region
6	<i>HTR1B</i>	rs13212041	78171124	T/C	0.181	Downstream region
6	<i>HTR1B</i>	rs6296	78172260	G/C	0.205	Synonymous variant
6	<i>HTR1B</i>	rs130058	78173281	A/T	0.384	Upstream region
6	<i>HTR1B</i>	rs11568817	78173382	G/T	0.446	Upstream region
6	<i>HTR1B</i>	rs4140535	78175052	C/T	0.265	Upstream region
7	<i>CRHR2</i>	rs4722999	30693775	T/C	0.361	Intronic region
7	<i>CRHR2</i>	rs3779250	30694260	A/G	0.422	Intronic region
7	<i>CRHR2</i>	rs2240403	30695202	C/T	0.145	Synonymous variant
7	<i>CRHR2</i>	rs975537	30697357	A/T	0.217	Intronic region
7	<i>CRHR2</i>	rs2270007	30699972	C/G	0.187	Intronic region
7	<i>CRHR2</i>	rs929377	30704159	T/A	0.416	Intronic region
7	<i>CRHR2</i>	rs2240404	30707302	G/A	0.229	Intronic region
7	<i>CRHR2</i>	rs2190242	30709475	A/C	0.247	Intronic region
7	<i>CRHR2</i>	rs6965973	30718460	C/T	0.157	Intronic region
7	<i>CRHR2</i>	rs917195	30728452	C/T	0.259	Intronic region
7	<i>SERPINE1</i>	rs2227631	100769538	A/G	0.398	Upstream region
7	<i>SERPINE1</i>	rs1799768	100769707	C/G	0.458	Upstream region
7	<i>SERPINE1</i>	rs6092	100771717	G/A	0.102	Missense variant
7	<i>SERPINE1</i>	rs2227672	100775686	G/T	0.120	Intronic region
7	<i>SERPINE1</i>	rs2227684	100776931	G/A	0.446	Intronic region
7	<i>SERPINE1</i>	rs1050813	100781615	G/A	0.211	3'UTR region

7	<i>SERPINE1</i>	rs1050955	100782460	G/A	0.211	3'UTR region
8	<i>CDH17</i>	rs2340019	95130632	C/T	0.355	Intergenic region
8	<i>CDH17</i>	rs2514788	95143744	T/C	0.476	Intronic region
8	<i>CDH17</i>	rs3779687	95171183	G/A	0.307	Intronic region
8	<i>CDH17</i>	rs7842215	95176404	T/C	0.464	Intronic region
8	<i>CDH17</i>	rs2514809	95181246	A/G	0.283	Intronic region
8	<i>CDH17</i>	rs16912	95188583	T/C	0.169	Intronic region
8	<i>CDH17</i>	rs755917	95215035	A/G	0.458	Intronic region
8	<i>CDH17</i>	rs6989467	95225173	G/A	0.259	Intronic region
8	<i>CDH17</i>	rs2607058	95227768	G/A	0.416	Intronic region
9	<i>NTRK2</i>	rs1659400	87325994	T/C	0.494	Intronic region
9	<i>NTRK2</i>	rs1187272	87404086	T/C	0.343	Intronic region
9	<i>NTRK2</i>	rs11140778	87447158	A/T	0.259	Intronic region
9	<i>NTRK2</i>	rs1822420	87467276	C/T	0.145	Intronic region
9	<i>NTRK2</i>	rs10868235	87493755	C/T	0.457	Intronic region
9	<i>NTRK2</i>	rs1387926	87632663	G/A	0.169	Intronic region
9	<i>RORB</i>	rs10491929	77137941	T/C	0.404	Intronic region
9	<i>RORB</i>	rs1157358	77238860	C/T	0.157	Intronic region
9	<i>RORB</i>	rs7022435	77244453	G/A	0.181	Intronic region
9	<i>RORB</i>	rs3903529	77264228	T/A	0.199	Intronic region
10	<i>UCN3</i>	rs12784234	5404261	T/G	0.205	Upstream region
10	<i>UCN3</i>	rs10904478	5404347	T/C	0.392	Upstream region
10	<i>UCN3</i>	rs11253130	5407871	C/G	0.337	Intronic region
10	<i>UCN3</i>	rs10904481	5415954	A/G	0.392	Missense variant
10	<i>UCN3</i>	rs11253141	5422196	A/C	0.422	Intergenic region
10	<i>UCN3</i>	rs10904487	5424465	T/C	0.319	Intergenic region
10	<i>UCN3</i>	rs11253143	5424727	A/G	0.367	Intergenic region
11	<i>ARNTL</i>	rs10832012	13293248	A/C	0.235	Intergenic region
11	<i>ARNTL</i>	rs7107287	13312969	G/T	0.229	Intronic region
11	<i>ARNTL</i>	rs7950226	13318139	G/A	0.458	Intronic region
11	<i>ARNTL</i>	rs7949336	13319894	A/G	0.223	Intronic region
11	<i>ARNTL</i>	rs11022762	13335926	C/T	0.373	Intronic region
11	<i>ARNTL</i>	rs11824092	13346294	C/T	0.355	Intronic region
11	<i>ARNTL</i>	rs12421530	13366722	G/C	0.404	Intronic region
11	<i>ARNTL</i>	rs1868049	13383682	C/T	0.108	Intronic region
11	<i>ARNTL</i>	rs11022779	13396810	G/A	0.211	Intronic region
11	<i>ARNTL</i>	rs11022780	13396909	C/T	0.500	Intronic region
11	<i>ARNTL</i>	rs2290035	13407771	A/T	0.494	Intronic region
11	<i>BDNF</i>	rs10501087	27670108	T/C	0.217	Intergenic region
11	<i>BDNF</i>	rs7124442	27677041	T/C	0.335	3'UTR region
11	<i>BDNF</i>	rs6265	27679916	G/A	0.205	Missense variant
11	<i>BDNF</i>	rs11030101	27680744	A/T	0.428	5'UTR region
11	<i>BDNF</i>	rs7103411	27700125	T/C	0.223	Intronic region
11	<i>BDNF</i>	rs16917237	27702383	G/T	0.232	Intronic region
11	<i>BDNF</i>	rs61888800	27722278	G/T	0.280	Intronic region
11	<i>BDNF</i>	rs962369	27734420	A/G	0.319	Intronic region
11	<i>BDNF</i>	rs12273363	27744859	T/C	0.229	Upstream region
11	<i>BDNF</i>	rs1491850	27749725	T/C	0.476	Intergenic region
11	<i>CRY2</i>	rs10838524	45870177	A/G	0.458	Intronic region

11	<i>CRY2</i>	rs2292913	45877529	C/T	0.102	Intronic region
11	<i>CRY2</i>	rs1401417	45880110	G/C	0.241	Intronic region
11	<i>CRY2</i>	rs7123390	45891418	G/A	0.265	Intronic region
11	<i>CRY2</i>	rs10838527	45903194	A/G	0.102	3'UTR region
11	<i>CRY2</i>	rs3824872	45905605	G/T	0.301	Upstream region
11	<i>GRIK4</i>	rs6589829	120530973	T/C	0.416	5'UTR region
11	<i>GRIK4</i>	rs1954787	120663363	C/T	0.476	Intronic region
11	<i>GRIK4</i>	rs4935752	120689119	A/C	0.325	Intronic region
11	<i>GRIK4</i>	rs6589846	120700147	T/G	0.361	Intronic region
11	<i>GRIK4</i>	rs4430518	120723433	T/G	0.271	Intronic region
11	<i>GRIK4</i>	rs2156634	120776001	T/C	0.181	Synonymous variant
11	<i>GRIK4</i>	rs12800734	120836754	A/G	0.352	Intronic region
11	<i>HTR3A</i>	rs1062613	113846006	C/T	0.253	5'UTR region
11	<i>HTR3A</i>	rs2276302	113850140	A/G	0.313	Intronic region
11	<i>HTR3A</i>	rs1176713	113860425	T/C	0.211	Synonymous variant
11	<i>HTR3A</i>	rs10891613	113862968	A/T	0.343	Downstream region
11	<i>MTNR1B</i>	rs1387153	92673828	C/T	0.295	Intergenic region
11	<i>MTNR1B</i>	rs2166706	92691532	T/C	0.422	Intergenic region
11	<i>MTNR1B</i>	rs10830962	92698427	C/G	0.416	Upstream region
11	<i>MTNR1B</i>	rs4753426	92701596	C/T	0.470	Upstream region
11	<i>MTNR1B</i>	rs10830963	92708710	C/G	0.271	Intronic region
11	<i>MTNR1B</i>	rs3781638	92713507	A/C	0.422	Intronic region
11	<i>MTNR1B</i>	rs1597023	92721319	A/G	0.452	Intergenic region
11	<i>TPH1</i>	rs12292915	18038118	A/C	0.404	Upstream region
11	<i>TPH1</i>	rs1799913	18047255	C/A	0.398	Intronic region
11	<i>TPH1</i>	rs1800532	18047816	C/A	0.392	Intronic region
11	<i>TPH1</i>	rs10832876	18059929	T/C	0.283	Intronic region
11	<i>TPH1</i>	rs7130929	18068163	C/A	0.464	Intergenic region
11	<i>TPH1</i>	rs4537731	18068882	T/C	0.464	Intergenic region
11	<i>TPH1</i>	rs4757610	18069421	G/A	0.464	Intergenic region
11	<i>TPH1</i>	rs4757611	18069536	A/C	0.464	Intergenic region
12	<i>GNB3</i>	rs4963517	6947800	G/A	0.434	Intronic region
12	<i>GNB3</i>	rs4963516	6948028	A/C	0.120	Intronic region
12	<i>GNB3</i>	rs1129649	6948468	T/C	0.271	Missense variant
12	<i>GNB3</i>	rs1047776	6948692	G/A	0.392	3'UTR region
12	<i>GNB3</i>	rs5439	6948882	A/C	0.133	3'UTR region
12	<i>GNB3</i>	rs5440	6948899	A/G	0.494	3'UTR region
12	<i>GNB3</i>	rs5443	6954875	C/T	0.392	Ssynonymous variant
12	<i>GNB3</i>	rs10744720	6964213	C/T	0.181	Intronic region
12	<i>NOS1</i>	rs11068428	117693817	G/A	0.295	Upstream region
12	<i>NOS1</i>	rs1879417	117803515	T/C	0.422	Downstream region
12	<i>TPH2</i>	rs4570625	72331923	G/T	0.253	Upstream region
12	<i>TPH2</i>	rs10748185	72335855	G/A	0.488	Intronic region
12	<i>TPH2</i>	rs1843809	72348698	T/G	0.139	Intronic region
12	<i>TPH2</i>	rs1386494	72352543	G/A	0.139	Intronic region
12	<i>TPH2</i>	rs1386492	72362265	A/G	0.214	Intronic region
12	<i>TPH2</i>	rs7305115	72372862	G/A	0.464	Synonymous variant
12	<i>TPH2</i>	rs1487276	72405059	G/A	0.181	Intronic region
12	<i>TPH2</i>	rs10879352	72406958	C/T	0.392	Intronic region

12	<i>TPH2</i>	rs1386485	72412367	A/C	0.44	Intronic region
12	<i>TPH2</i>	rs17110747	72425954	G/A	0.108	Missense variant
13	<i>HTR2A</i>	rs7333412	47403360	A/G	0.241	3'UTR region
13	<i>HTR2A</i>	rs3125	47408851	G/C	0.145	Missense variant
13	<i>HTR2A</i>	rs7322347	47410103	A/T	0.470	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs1923882	47411661	C/T	0.235	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs7997012	47411985	G/A	0.343	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs9567736	47420983	G/A	0.108	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs9567737	47421266	T/C	0.439	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs622337	47427626	T/C	0.259	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs2770298	47446847	T/C	0.277	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs1002513	47454440	C/T	0.157	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs985934	47455725	T/C	0.386	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs927544	47456051	T/C	0.271	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs17288723	47457693	T/C	0.145	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs4942587	47462800	A/G	0.229	Intronic region
13	<i>HTR2A</i>	rs9534511	47468580	C/T	0.451	Synonymous variant
13	<i>HTR2A</i>	rs6313	47469940	C/T	0.470	Upstream region
13	<i>HTR2A</i>	rs6311	47471478	C/T	0.468	Intronic region
15	<i>RORA</i>	rs12914584	60818086	T/G	0.331	Intronic region
15	<i>RORA</i>	rs4774370	60893431	T/C	0.253	Intronic region
15	<i>RORA</i>	rs3784609	60910550	G/A	0.259	Intronic region
15	<i>RORA</i>	rs12912233	61267096	C/T	0.416	Intronic region
15	<i>RORA</i>	rs809736	61329788	A/G	0.217	3'UTR region
15	<i>RORA</i>	rs893287	61394232	G/A	0.386	Intronic region
17	<i>ACE</i>	rs4305	61558229	G/A	0.476	Intronic region
17	<i>ACE</i>	rs4316818	61584627	C/T	0.398	Synonymous variant
17	<i>ACE</i>	rs4459610	61584720	T/A	0.398	Missense variant
17	<i>ACE</i>	rs8066276	61589265	C/T	0.360	3'UTR region
17	<i>ACE</i>	rs12452105	61590824	T/A	0.392	Downstream region
17	<i>PPP1R1B</i>	rs1874228	37775274	G/A	0.313	Intronic region
17	<i>PPP1R1B</i>	rs879606	37781849	G/A	0.175	Intronic region
17	<i>PPP1R1B</i>	rs907094	37790371	T/C	0.277	3'UTR region
17	<i>PPP1R1B</i>	rs3764352	37790939	A/G	0.277	3'UTR region
17	<i>SLC6A4</i>	rs1042173	28525011	T/G	0.494	Intronic region
17	<i>SLC6A4</i>	rs2020936	28550814	T/C	0.175	Intronic region
17	<i>SLC6A4</i>	rs2066713	28551665	C/T	0.313	Intronic region
17	<i>SLC6A4</i>	rs4251417	28551858	G/A	0.102	Upstream region
17	<i>SLC6A4</i>	rs7214991	28572360	A/G	0.295	Upstream region
17	<i>STAT3</i>	rs1053023	40465616	A/G	0.211	3'UTR region
17	<i>STAT3</i>	rs1053005	40465910	A/G	0.211	3'UTR region
17	<i>STAT3</i>	rs1053004	40466092	T/C	0.440	Intronic region
17	<i>STAT3</i>	rs3744483	40466438	T/C	0.211	Intronic region
17	<i>STAT3</i>	rs3809758	40471980	G/A	0.211	Intronic region
17	<i>STAT3</i>	rs2293152	40481529	G/C	0.440	Intronic region
17	<i>STAT3</i>	rs6503695	40499533	T/C	0.313	Upstream region
17	<i>STAT3</i>	rs744166	40514201	T/C	0.428	Intronic region
17	<i>STAT3</i>	rs4796793	40542210	C/G	0.283	Synonymous variant
19	<i>TGFB1</i>	rs2241718	41829606	C/T	0.175	Upstream region

19	<i>TGFB1</i>	rs10417924	41833167	C/T	0.235	Intronic region
19	<i>TGFB1</i>	rs1800469	41860296	C/T	0.361	Intronic region
19	<i>TGFB1</i>	rs11666933	41862253	A/G	0.422	Intronic region
22	<i>COMT</i>	rs9606186	19920359	G/C	0.355	Intronic region
22	<i>COMT</i>	rs1800706	19928022	G/A	0.313	Intronic region
22	<i>COMT</i>	rs4646310	19928806	G/A	0.211	Intronic region
22	<i>COMT</i>	rs2020917	19928884	C/T	0.325	Intronic region
22	<i>COMT</i>	rs13306278	19929027	C/T	0.139	Intronic region
22	<i>COMT</i>	rs737865	19930121	T/C	0.325	Intronic region
22	<i>COMT</i>	rs1544325	19931668	G/A	0.355	Intronic region
22	<i>COMT</i>	rs5993882	19937533	T/G	0.313	3'UTR region
22	<i>COMT</i>	rs4646312	19948337	T/C	0.458	3'UTR region
22	<i>COMT</i>	rs165737	19952501	C/T	0.271	Missense variant
22	<i>COMT</i>	rs165599	19956781	A/G	0.370	Intronic region
22	<i>COMT</i>	rs165815	19959473	T/C	0.179	Intronic region
22	<i>MIF</i>	rs1129067	24228125	C/T	0.355	Intronic region
22	<i>MIF</i>	rs5760090	24233592	C/T	0.361	5'UTR region
22	<i>MIF</i>	rs4822443	24235198	G/A	0.114	Intronic region
22	<i>MIF</i>	rs755622	24236392	C/G	0.120	Upstream region
22	<i>MIF</i>	rs5760093	24240340	A/G	0.313	Intronic region
22	<i>MIF</i>	rs2000467	24241533	G/A	0.440	Intronic region
X	<i>MAOA</i>	rs6323	43591036	T/G	0.205	Downstream region
X	<i>MAOA</i>	rs1137070	43603391	C/T	0.205	Intergenic region
X	<i>MAOA</i>	rs2064070	43608682	A/T	0.211	Upstream region
X	<i>MAOA</i>	rs6609257	43612708	A/G	0.301	Upstream region

The 63 SNPs located in genes related to the serotonergic system are highlighted in bold.

Abbreviations: Chr, Chromosome; MAF, minimum allele frequency

^aChromosome position based on GRCh37.p13 assembly.

^bMajor/minor allele

Supplemental Digital Content 3. Clinical improvement experienced by patients diagnosed with Major Depression Disorder (MDD), Obsessive Compulsive Disorder (OCD) or Generalized Anxiety Disorder (GAD).

	CDI ¹ (Mean ± SD)	OCI-CV ² (Mean ± SD)	SCARED (Mean ± SD)	GAF/CGAS ³ (Mean ± SD)	CGI-S (Mean ± SD)	CGI-I (Mean ± SD)
MDD	10.5 ± 7.9	3.7 ± 7.2	5.0 ± 14.1	19.4 ± 14.9	1.7 ± 1.2	2.7 ± 1.2
OCD	5.7 ± 8.9	3.1 ± 5.5	2.8 ± 10.3	11.2 ± 8.8	1.2 ± 0.8	3.1 ± 0.9
GAD	5.6 ± 4.7	-0.8 ± 4.0	7.2 ± 11.5	20 ± 13.3	1.3 ± 0.7	2.6 ± 1.3

¹P=0.021 (MDD vs OCD); ² P=0.019 (MDD vs GAD); ³P=0.035 (MDD vs OCD).

4.4 Estudio 4. Farmacogenética de la fluoxetina 2

Gassó P*, Rodríguez N*, Blázquez A, Monteagudo A, Boloc D, Plana MT, Lafuente A, Lázaro L, Arnaiz JA, Mas S. **Epigenetic and genetic variants in the *HTR1B* gene and clinical improvement in children and adolescents treated with fluoxetine.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*2017; 75: 28-34 (*igual contribución)

Los tres polimorfismos del gen *HTR1B* seleccionados para el estudio (rs9361233, rs6297 y rs9361235) se encontraban localizados en lugares de unión a diferentes factores de transcripción como TST1, XBP1, Rad21 y CTCF. Dos de los SNPs, rs9361233 y rs9361235, se asociaron significativamente con la mejoría clínica en los pacientes pediátricos, siendo en ambos casos los individuos heterocigotos los que experimentaron una menor respuesta terapéutica en todas las escalas de evaluación. No obstante, esta asociación alcanzó la significación tras las correcciones de Bonferroni al evaluar la respuesta en base a las puntuaciones en la escala CGI-I (rs9361233: $p=0.0018$; rs9361235: $p=0.0016$) y de acuerdo con los cambios de puntuación en la escala OCI-CV (rs9361233: $p=0.00059$) (figura 12).

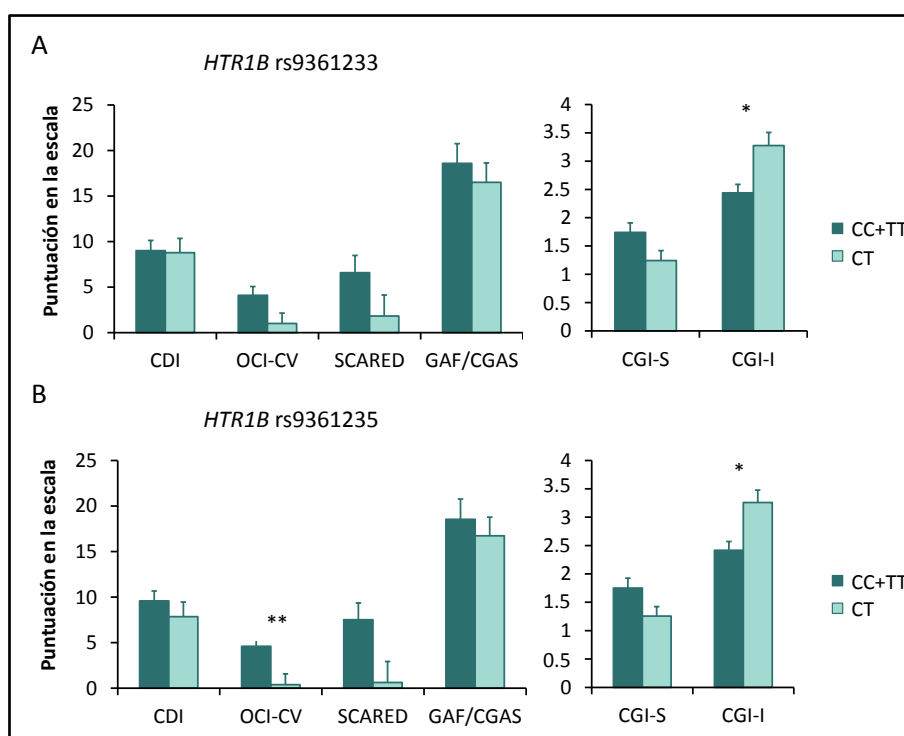


Figura 12. Efecto de los polimorfismos rs9361233 (A) y rs9361235 (B) del gen *HTR1B* en la mejoría clínica determinada en base a las diferencias en la puntuación de las distintas escalas tras el tratamiento con fluoxetina. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p<0.002$; ** $p<0.0006$, significativo tras la corrección de Bonferroni.

En base a estos resultados, se analizaron conjuntamente estos dos polimorfismos (rs9361233 y rs9361235) junto al SNP significativamente asociado (rs130058) con la respuesta terapéutica a fluoxetina en el estudio anterior (*estudio 3*), localizado también en un lugar de unión a factor de transcripción (ARP1). En el estudio haplotípico únicamente se encontró un haplotipo con una frecuencia muy baja que estuviera asociado con la respuesta clínica. En cambio, el análisis conjunto de los genotipos de estos tres polimorfismos mostró que la combinación de los genotipos heterocigotos en un individuo se correlacionaba negativamente con la respuesta clínica de manera que, en comparación con los individuos homocigotos para los tres SNPs (N=39), los pacientes heterocigotos para al menos uno de los polimorfismos (N=25) experimentaron menos mejoría, mientras que los heterocigotos para los tres SNPs (N=19) fueron los que experimentaron una peor respuesta. Esta correlación fue significativa para la mayoría de las escalas: OCI-CV ($p=0.00007$), SCARED ($p=0.0013$), GAF/CGAS ($p=0.004$), CGI-S ($p=0.004$) y CGI-I ($p=0.00002$). La figura 13 muestra la correlación existente entre los genotipos de estos tres polimorfismos y la mejoría clínica.

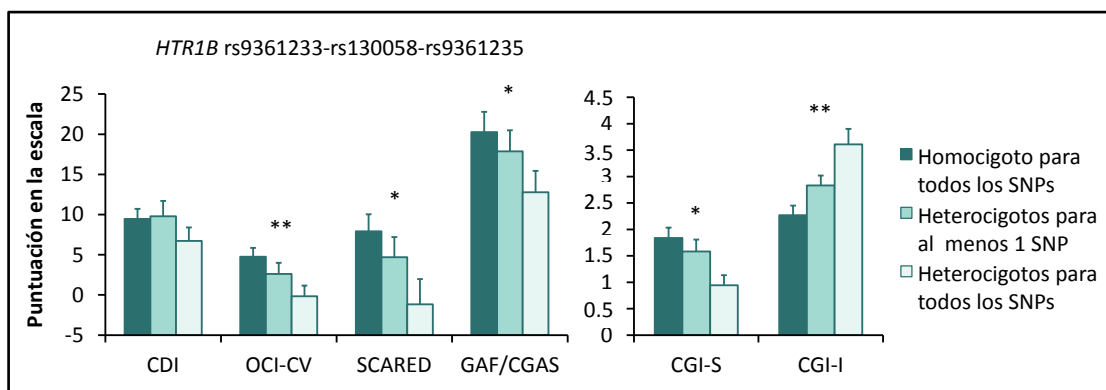


Figura 13. Efecto de la combinación de genotipos para los polimorfismos rs9361233, rs130058 y rs9361235 del gen *HTR1B* en la mejoría clínica determinada en base a las diferencias en la puntuación de las escalas tras el tratamiento con fluoxetina. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p<0.008$; ** $p<0.0001$, significativo tras la corrección de Bonferroni.

Por lo que respecta a la evaluación de los niveles de metilación, se detectó que la región promotora del gen *HTR1B* presentaba un grado de metilación que oscilaba desde el 28% para la posición CpG1 al 43% para CpG5. El valor promedio de metilación de las 7 CpGs de dicha región presentó una elevada correlación con los niveles de metilación individuales de cada una de las posiciones CpG ($r>0.7$; $p<0.0001$). Además, se observó que el nivel medio de metilación se encontraba correlacionado negativamente con la mejoría clínica de acuerdo con los cambios de puntuación en la escala GAF/CGAS ($r=-0.335$; $p=0.004$), de modo que los individuos con unos niveles más bajos de metilación presentaban una mayor respuesta terapéutica.



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

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

Epigenetic and genetic variants in the *HTR1B* gene and clinical improvement in children and adolescents treated with fluoxetine



Patricia Gassó^{a,e,1}, Natalia Rodríguez^{a,1}, Ana Blázquez^b, Ana Monteagudo^a, Daniel Boloc^a, Maria Teresa Plana^b, Amalia Lafuente^{a,e,f}, Luisa Lázaro^{b,d,e,f}, Joan Albert Arnaiz^{a,c,e,*}, Sergi Mas^{a,e,f,**}

^a Department of Pathological Anatomy, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, Spain

^b Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychology, Institute of Neurosciences, Hospital Clinic de Barcelona, Spain

^c Clinical Pharmacology Department, Hospital Clinic de Barcelona, Spain

^d Department of Psychiatry and Clinical Psychobiology, University of Barcelona, Spain

^e Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^f Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2016

Received in revised form 9 December 2016

Accepted 19 December 2016

Available online 23 December 2016

Keywords:

Fluoxetine

Pharmacogenetics

Methylation

Children

HTR1B

Polymorphism

ABSTRACT

The serotonin 1B receptor (5-HT_{1B}) is important to both the pathogenesis of major depressive disorder and the antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors. Although fluoxetine has been shown to be effective and safe in children and adolescents, not all patients experience a proper clinical response, which has led to further study into the main factors involved in this inter-individual variability. Our aim was to study the effect of epigenetic and genetic factors that could affect 5-hydroxytryptamine receptor 1B (*HTR1B*) gene expression, and thereby response to fluoxetine. A total of 83 children and adolescents were clinically assessed 12 weeks after of initiating an antidepressant treatment with fluoxetine for the first time. We evaluated the influence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) specifically located in transcription factor binding sites (TFBSs) on their clinical improvement. A combined genetic analysis considering the significant SNPs together with the functional variant rs130058 previously associated in our population was also performed. Moreover, we assessed, for the first time in the literature, whether methylation levels of the *HTR1B* promoter region could be associated with the pharmacological response. Two, rs9361233 and rs9361235, were significantly associated with clinical improvement after treatment with fluoxetine. The heterozygous genotype combination analysis showed a negative correlation with clinical improvement. The lowest improvement was experienced by patients who were heterozygous for all three SNPs. Moreover, a negative correlation was found between clinical improvement and the average methylation level of the *HTR1B* promoter. These results give new evidence for the role of epigenetic and genetic factors which could modulate *HTR1B* expression in the pharmacological response to antidepressants.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The effectiveness and safety of fluoxetine have been shown in children and adolescents with different psychiatric disorders, including major depressive disorder (MDD), obsessive compulsive disorder (OCD), and generalized anxiety disorder (GAD) (Keeton et al., 2009; Usala et al., 2008; Wilens et al., 2002). However, not all patients experience a proper clinical response, which has led to further study into the main factors involved in this inter-individual variability (Blázquez et

al., 2012, 2014; Gassó et al., 2014; Mas et al., 2016). Following the development of selective serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) reuptake inhibitors (SSRIs), much research attention has focused on the serotonergic targets, including the 5-HT transporter and 5-HT receptors. To date seven families of 5-HT receptors have been identified, some of which have several subtypes (Artigas, 2013).

5-HT_{1B} receptors are widely distributed throughout the brain in both pre- and post-synaptic locations. Autoreceptors are found on serotonergic axons, where they regulate serotonin synthesis and release, while heteroreceptors are distributed in post-synaptic locations and control other synaptic transmissions (Castro et al., 1998; Sari, 2004). Results from different studies give support for the involvement of 5-HT_{1B} in the pathogenesis of MDD (Fakhoury, 2016; Sanders et al., 2002) or OCD (Shanahan et al., 2011; Mas et al., 2014). Although no single nucleotide polymorphisms (SNPs) achieved genome-wide significance in the largest genome-wide analysis of MDD, a genetic marker close to *HTR1B*

* Correspondence to: J.A. Arnaiz, Department of Pathological Anatomy, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain.

** Correspondence to: S. Mas, Department of Pathological Anatomy, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, IDIBAPS, Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain.
E-mail addresses: JAARNAIZ@clinic.ub.es (J.A. Arnaiz), sergimash@ub.edu (S. Mas).

¹ These authors contributed equally to this work.

was found in the list of the SNPs with lowest *P*-values (Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium et al., 2013). Interestingly, *HTR1B* knockout mice display a variety of behavioral changes, including decreased anxiety levels (Zhuang et al., 1999), and some of the effects of SSRI drugs are lacking in these animals (Lotrich and Pollock, 2005). In fact, there is evidence that *HT_{1B}* has an important role in antidepressant treatment (Ruf and Bhagwagar, 2009). Although acute SSRIs administration activates terminal 5-HT_{1B} receptors, thus reducing serotonin synthesis and release, chronic administration also results in desensitization of terminal autoreceptors that seems crucial to the therapeutic profile of SSRIs. Thus, such drugs act in a time-dependent and reversible manner to reduce 5-HT_{1B} mRNA levels, which could be involved in the reduction of depressive symptoms (Anthony et al., 2000; Neumaier et al., 1996).

Genetic variants in *HTR1B* have been associated with antidepressant response and certain behavioral traits during antidepressant treatment (Lenze et al., 2013; Perroud et al., 2011). In a recent study by our group, in which >300 polymorphisms were assessed in 45 candidate genes, the *HTR1B* rs130058 was associated with clinical improvement (Mas et al., 2016). This polymorphism is located in the promoter gene region and its functionality has been shown in previous cell culture studies (Sun et al., 2002). However, it seems that other functional polymorphisms are also present in the *HTR1B* promoter, resulting in a complex balancing of the regulation of gene transcription (Duan et al., 2003).

Based on all this background, we considered it interesting to deepen the study of genetic and epigenetic factors that could affect *HTR1B* gene expression and, therefore, response to antidepressants. To this end, we evaluated the influence of genetic variants specifically located in transcription factor binding sites (TFBSs) on clinical improvement in children and adolescents treated with fluoxetine. A combined genetic analysis considering the associated SNPs together with the functional variant rs130058 was also performed. Moreover, we assessed, for the first time in the literature, whether methylation levels at the *HTR1B* promoter region could also be associated with pharmacological response.

2. Subjects and methods

2.1. Patients and clinical improvement assessment

A total of 83 children and adolescents aged between 10 and 17 years of age receiving fluoxetine treatment for the first time were recruited. Patients were diagnosed with MDD, OCD or GAD according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV (DSM-IV) (American Psychiatry Association, 1994). The study was conducted at the Child and Adolescent Psychiatry and Psychology Service of the Institute of Neuroscience at the Hospital Clinic in Barcelona. Exclusion criteria were mental retardation, somatic or neurological disease, autism, psychotic disorders, and non-Caucasian ethnicity. All subjects began fluoxetine treatment in the initial phase of the study, being the first time that they received an antidepressant treatment. Some patients were temporarily co-medicated with antipsychotics, benzodiazepines or mood stabilizers (Table 1).

Information on illness severity was obtained in the initial phase of the study by the assessment with the following scales: the Children's Depression Inventory (CDI) (Kovacs, 1992), the Obsessive Compulsive Inventory-Child Version (OCI-CV) (Foa et al., 2010), the Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED) (Birmaher et al., 1997), either the Global Assessment of Functioning scale (GAF) (Luborsky, 1962) or the Children's Global Assessment Scale (CGAS) (Shaffer et al., 1983) and the Clinical Global Impression-Severity scale (CGI-S) (Guy, 1976). The same scales were administered after 12 weeks of fluoxetine treatment. Differences between baseline scores and scores obtained after 12 weeks of treatment were calculated to evaluate the clinical improvement. Values were computed to show higher differences in scale scores as higher improvement as follows: $dCDI = CDI_{Week\ 0} - CDI_{Week\ 12}$; $dOCI-CV = OCI-CV_{Week\ 0} - OCI-CV_{Week\ 12}$;

Table 1
Demographic, clinical, and genotype data of the study population.

	Patients (N = 83)
Male gender, N (%)	26 (31.3)
Age (years, mean ± SD)	14.7 ± 1.7
Diagnosis, N (%)	
MDD	57 (68.7)
OCD	16 (19.3)
GAD	10 (12)
Co-medication, N (%)	
Antipsychotics	9 (10.8)
Benzodiazepines	7 (8.4)
Antipsychotics + Benzodiazepines	2 (2.4)
Antipsychotics + Mood stabilizers	2 (2.4)
Baseline scale score (mean ± SD)	
CDI	26.1 ± 9.7
OCI-CV	16.2 ± 7.9
SCARED	34.5 ± 13.4
GAF/CGAS	44.6 ± 11.7
CGI-S	4.8 ± 0.8
Scale score at week 12 (mean ± SD)	
CDI	17.2 ± 10.1
OCI-CV	13.4 ± 7.6
SCARED	29.9 ± 14.7
GAF/CGAS	62.3 ± 10.2
CGI-S	3.3 ± 0.87
CGI-I	2.8 ± 1.2
Genotype frequencies, N (%)	
rs9361233	
CC	31 (37.3)
CT	30 (36.1)
TT	22 (26.5)
rs6297	
TT	65 (78.3)
TC	17 (20.5)
CC	1 (1.2)
rs9361235	
TT	29 (34.9)
TC	32 (38.5)
CC	22 (26.5)

Abbreviations: CDI, Children's Depression Inventory; CGI-I, Clinical Global Impression-Improvement scale; CGI-S, Clinical Global Impression-Severity scale; GAD, Generalized Anxiety Disorder; GAF/CGAS, Global Assessment of Functioning scale/Children's Global Assessment Scale; MDD, Major Depression Disorder; OCD, Obsessive Compulsive Disorder; OCI-CV, Obsessive Compulsive Inventory-Child Version; and SCARED, Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders.

$dSCARED = SCARED_{Week\ 0} - SCARED_{Week\ 12}$; $dGAF/CGAS = GAF/CGAS_{Week\ 12} - GAF/CGAS_{Week\ 0}$; $dCGI-S = CGI-S_{Week\ 0} - CGI-S_{Week\ 12}$. Clinical improvement was also assessed using the CGI-Improvement scale (CGI-I) (Guy, 1976) after 12 weeks of fluoxetine treatment, with high CGI-I scale scores indicating in this case lower improvement. Missing data did not enable to calculate scores in five (dCDI, dOCI-CV, dSCARED scales) or four patients (dGAF-CGAS, dCGI-S, CGI-I scales). More information regarding the clinical scales administered can be found in the Supplementary material.

All procedures were approved by the hospital's Ethics Committee. Written informed consent was obtained from all parents, and verbal informed consent was given by all subjects after receiving an explanation of the procedures involved.

2.2. Sample preparation

Blood samples from participants were collected in EDTA (K2EDTA BD Vacutainer EDTA tubes; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey). Genomic DNA was extracted using the MagNA Pure LC DNA isolation Kit III and an LC MagNA Pure system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The concentration and quality of DNA were measured spectrophotometrically using a NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Surrey, UK).

2.3. SNP selection and genotyping

We selected *HTR1B* SNPs specifically located in TFBSs, which could therefore be responsible for altered *HTR1B* gene expression. First, we identified all common SNPs ($N = 38$) and TFBSs ($N = 119$) located in the *HTR1B* locus, including those in upstream and downstream regions (gene target ± 4 kilobase: chromosome 6: 781717948–78173120 on the hg-19), using the UCSC Genome Browser database (www.genome.ucsc.edu) (Fig. S1). A total of 9 SNPs were specifically located in the identified TFBS (Table 2). Finally, we analyzed those SNPs with minor allele frequency (MAF) higher than 10% (based on the CEU panel of 1000 genomes population genetics data; <http://www.ensembl.org>) that had not previously been genotyped in our sample were analyzed. Finally, the selection included the rs9361233, rs6297 and rs9361235 SNPs (Table 2).

The polymorphisms were genotyped using TaqMan genotyping assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on a 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK).

2.4. DNA methylation analysis

A relevant CpG island in the *HTR1B* promoter was identified using the UCSC Genome Browser database (www.genome.ucsc.edu), which contains 131 CpGs through 1861 base pairs. Pyro Mark Assay Design software was used to design the best primers to amplify a region containing a high CpG density to analyze the methylation level of the region. First, genomic DNA (500 ng) was bisulfite-modified using the EpiTect Plus Bisulfite Conversion Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Then, PCR amplification of bisulphate-converted DNA was performed with the Pyro Mark PCR kit (Qiagen) using the specific primers (HTR1B_FW: 5'-GGTGGGTGAAGTTTAGGA-3'; HTR1B_R: 5'-Biotin- AACCCCTATCCCCCTTTAT-3; and HTR1B_sequencing: 5'-GGGTGAAGTTTAGGAGTA-3'). A total of seven CpG sites were included in the amplified region (CGCCTGCGCCGCTCGCCGGAG_chromosome 6: 77463994–77464019 on the hg-38). Methylated CpG sites in sequencing reactions were detected with a pyrosequencing system (Tost and Gut, 2007). PyroMark Gold Q96 reagents and the Pyrosequencer Analyzer PyroMark Q96 (Qiagen) were used for the pyrosequencing and data analysis, according to the manufacturer's instructions. Unmethylated and methylated DNA standards were used from EpiTect Control DNA Kit (Qiagen).

2.5. Statistical analysis

Sample size and statistical power calculations were performed with Quanto 1.2 software. Given the sample size, mean and standard deviations of scale scores, and assuming a 5% level of significance, we were able to detect the following mean changes (β_c) in the different scale

scores with >80% statistical power for MAFs ranging from 0.38 to 0.17: 3.5–4.5 for dCDI; 3.4–3.8 for dOCI-CV; 5.8–7.4 for dSCARED; 6.1–7.9 for dGAF/CGAS; 0.50–0.64 for dCGI-S and 0.52–0.68 for CGI-I.

Data were analyzed using IBM SPSS statistics 20 (IBM Corp., Chicago, Ill, USA). Means and standard deviations were computed for continuous variables. To identify variables associated with clinical improvement, Pearson's or Spearman's correlations, Student's *t*-test, ANOVA, Mann-Whitney U, or Kruskal-Wallis test were used, according to the distribution and scales of the variables.

In the SNP association analysis, Hardy-Weinberg equilibrium was analyzed for each SNP. To estimate the independent contribution of each SNP to clinical improvement, multivariate methods based on logistic regression analyses were performed, adjusted for diagnosis and the corresponding baseline score obtained for each scale. The best model of inheritance, out of codominant, dominant, recessive, overdominant and additive models, was selected using the Akaike information criterion (AIC). To avoid false positive results, we applied Bonferroni correction for multiple testing (0.05/number of comparisons). We evaluated the effect of three SNPs on clinical improvement assessed by six clinical scales: dCDI, dOCI-CV, dSCARED, dGAF/CGAS, dCGI-S, and CGI-I; thus, 18 comparisons were analyzed (significant P -value < 0.0028). A haplotype and genotype combination analysis was also performed, adjusting for diagnosis and the corresponding baseline score for each scale. For these purposes, we used the SNPpass R package, and IBM SPSS statistics 20 (IBM Corp., Chicago, Ill, USA) for partial correlations.

Finally, we calculated the average methylation levels of the seven identified CpG sites. Partial correlation analyses were performed between methylation level and clinical improvement, as assessed by score changes in the CDI, OCI-CV, SCARED, GAF/CGAS, and CGI-S scales, as well as the CGI-I scores. Correlations were adjusted for diagnosis and the corresponding baseline score for each scale. After Bonferroni correction, a P -value < 0.008 (six comparisons) was considered significant.

3. Results

Demographic, clinical, and genotype data are shown in Table 1. The mean fluoxetine dose administered was 25.2 ± 11.9 mg/day, with 20 mg/day and 40 mg/day being administered to the majority of patients. Some patients were temporally co-medicated with antipsychotics (15.6%), benzodiazepines (10.8%), or mood stabilizers (2.4%). There were no significant differences in clinical improvement between patients treated only with fluoxetine and those receiving co-medication, but there were some significant differences among patients with different diagnoses (Table S1). Moreover, we found significant correlations between baseline scores on the scales and clinical response (CDI: $r = 0.37$, $P = 0.001$; OCI-CV: $r = 0.48$, $P < 0.001$; SCARED: $r = 0.41$, $P < 0.001$; GAF/CGAS: $r = -0.59$, $P < 0.001$; CGI-S: $r = 0.60$, $P < 0.001$), indicating that patients with worse baseline scores tended to have a better response. Based on these findings, the genetic association analysis was adjusted accordingly.

The SNP selection included rs9361233, rs6297 and rs9361235, which were located in the downstream, 3'-untranslated region (UTR) and upstream region of the *HTR1B* gene, respectively (Table 2). The SNPs were located in binding sites for different transcription factors, including TST1, XBP1, Rad21, and CTCF. Their genotype frequencies are shown in Table 1. All genotypes were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium (P -value > 0.05). Two SNPs, rs9361233 and rs9361235, were significantly associated with lower clinical improvement after treatment with fluoxetine in our pediatric population. Particularly, heterozygous patients for rs9361233 showed higher scores on the CGI-I scale ($P = 0.0018$) (Fig. 1A; Table S2), while heterozygous patients for rs9361235 showed both higher scores on the CGI-I scale ($P = 0.0016$) and lower score reductions on the OCI-CV scale ($P = 0.00059$) (Fig. 1B; Table S2).

Based on these data, we analyzed these two significant SNPs (rs9361233 and rs9361235) together with the SNP associated in our

Table 2
HTR1B SNPs located in transcription factor binding sites.

SNP ^a	Chromosome position ^b	Gene position	Alleles	MAF ^c	Transcription factor
rs9361233	6:77460345	Downstream	T/C	0.374	TST1
rs1145836	6:77460346	Downstream	A/G	0	TST1
rs6297	6:77462224	3'-UTR	T/C	0.172	XBP1
rs6296	6:77462543	Synonymous	C/G	0.323	PPARA
rs6298	6:77463275	Synonymous	G/A	0.323	ZID
rs130058	6:77463564	Upstream	T/A	0.237	ARP1
rs12181240	6:77464278	Upstream	G/A	0	AHR
rs9361235	6:77466125	Upstream	C/T	0.379	Rad21, CTCF
rs61706376	6:77466186	Upstream	G/A	0.005	Rad21, CTCF

^a SNPs in bold were selected to be analyzed in the present study, which had MAF higher than 10% and had not previously been analyzed in our sample.

^b According to the hg-38.

^c Based on the CEU panel of 1000 genomes population genetics data; <http://www.ensembl.org>.

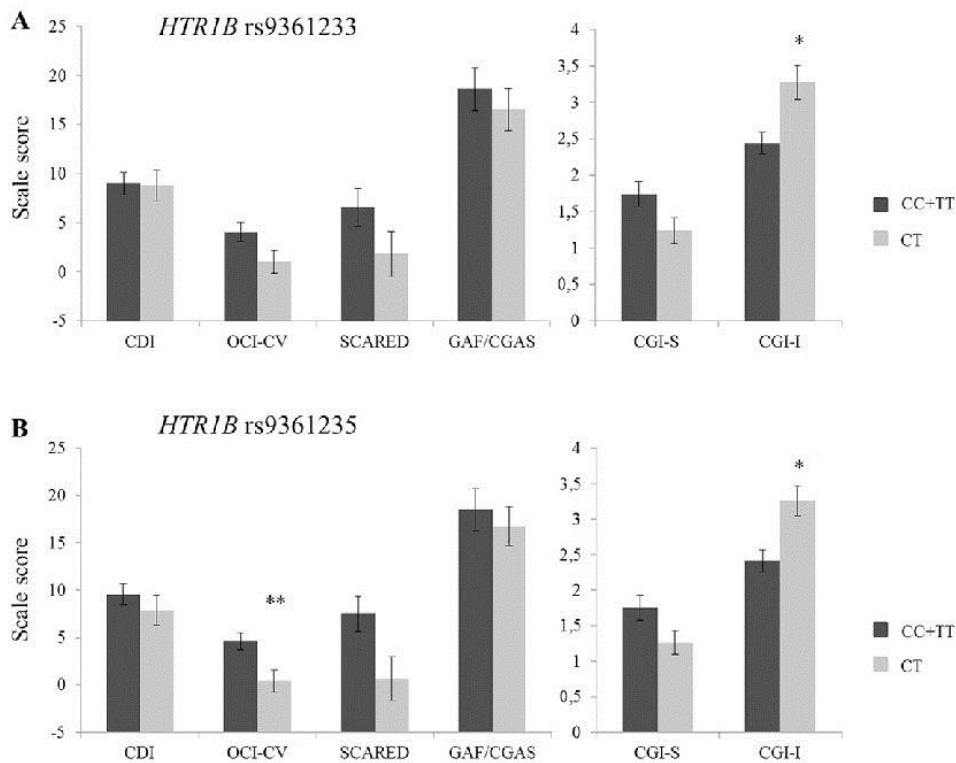


Fig. 1. Effect of *HTR1B* rs9361233 (A) and *HTR1B* rs9361235 (B) on clinical improvement measured by differences in scale scores obtained after fluoxetine treatment. Scale scores show increases in the GAF/CGAS, decreases in the CDI, OCI-CV, SCARED and CGI-S, and the CGI-I scales. Higher scale scores indicate higher improvement, except for the CGI-I scale, in which lower scores indicate higher improvement. The analysis was adjusted for diagnosis and the corresponding baseline score obtained for each assessed scale. Results are expressed as means \pm SEM. * $P < 0.002$; ** $P < 0.0006$.

previous investigation (rs130058), which is also located in a TFBS. In the haplotype analysis, only one inferred haplotype, with very low frequency, was associated with clinical response (Table S3).

Interestingly, the heterozygous genotype combination analysis showed a negative correlation with the improvement. Compared to patients who were homozygous for the three SNPs ($N = 39$), clinical improvement was lower in patients who were heterozygous for at least one of the SNPs ($N = 25$). The lowest improvement was shown by patients who were heterozygous for all three SNPs ($N = 19$) (Fig. 2). Regressions were also significant for the majority of the clinical scales assessed: dOCI-CV ($P = 0.00007$), dSCARED ($P = 0.0013$), dGAF/CGAS ($P = 0.004$), dCGI-S ($P = 0.004$), and CGI-I ($P = 0.00002$). It is

important to note that in our population all heterozygous patients for the rs9361233 were at the same time heterozygotes for the rs9361235 due to the high linkage disequilibrium (LD) between both variants ($D' = 0.97$; $r^2 = 0.90$). Therefore, the heterozygous genotype combination analysis showed the same results when just one of these SNPs was considered.

Methylation in the *HTR1B* promoter region ranged from 28% (CpG1) to 43% (CpG5). The average methylation level of the seven CpGs analyzed was highly correlated with each individual CpG ($r > 0.7$; $P < 0.0001$). A negative correlation was found between the average methylation level and clinical improvement assessed by score differences in the GAF/CGAS scale ($r = -0.335$; $P = 0.004$) (Table 3).

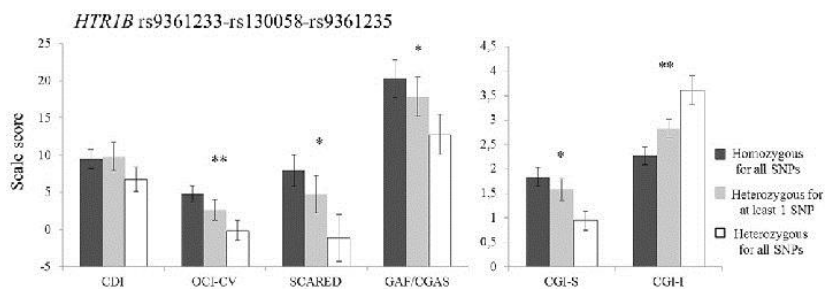


Fig. 2. Effect of the genotype combinations of *HTR1B* rs9361233, rs130058, and rs9361235 on clinical improvement measured by differences in scale scores obtained after fluoxetine treatment. Scale scores show increases in the GAF/CGAS, decreases in the CDI, OCI-CV, SCARED and CGI-S, and the CGI-I scales. Higher scale scores indicate higher improvement, except for the CGI-I scale, in which lower scores indicate higher improvement. The analysis was adjusted for diagnosis and the corresponding baseline score obtained for each assessed scale. Results are expressed as means \pm SEM. * $P < 0.008$; ** $P < 0.0001$.

Table 3
Partial correlations between clinical improvement and the average methylation levels of seven CpGs in the *HTR1B* promoter region.

	dCDI	dOCI	dSCARED	dGAF/CGAS	dCGI-S	CGI-I
<i>HTR1B</i> methylation level	$r = -0.174$ $P = 0.139$	$r = -0.033$ $P = 0.780$	$r = -0.129$ $P = 0.272$	$r = -0.335$ $P = 0.004$	$r = -0.233$ $P = 0.046$	$r = 0.167$ $P = 0.154$

Correlations were adjusted for diagnostic and the corresponding basal score obtained in each assessed scale. Abbreviations: CDI, Children's Depression Inventory; CGI-I, Clinical Global Impression-Improvement scale; CGI-S, Clinical Global Impression-Severity scale; GAF/CGAS, Global Assessment of Functioning scale/Children's Global Assessment Scale; OCI-CV, Obsessive Compulsive Inventory-Child Version; and SCARED, Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders.

Significant correlations after Bonferroni correction (P -value < 0.008) are shown in bold.

As both the genetic markers and methylation in *HTR1B* were associated with clinical improvement, we assessed if the SNPs were in fact associated with the gene methylation level. The genetic association analysis did not show significant results, which evidences the independent effect of both factors on clinical response.

4. Discussion

The results of the present study give, for the first time, evidence for the involving of both (1) *HTR1B* polymorphisms rs9361233 and rs936135; and (2) the methylation level of the *HTR1B* promoter region in clinical improvement after fluoxetine treatment in children and adolescents.

Particularly, heterozygous patients for these polymorphisms experienced lower clinical improvement, showing higher scores on the CGI-I scale and lower score reductions on the OCI-CV scale. Although significant differences after Bonferroni correction were detected only for particular scales, it is important to remark that the same pattern in score changes was observed for all the clinical scales. Both the rs9361233 and the rs936135 SNPs are located at 3'-UTR and 5' upstream TFBSs regulatory regions, respectively. These SNPs could alter the normal binding of three different transcription factors expressed in neurons: Tst-1, CTCF and Rad-21. Tst-1 seems to have an important role in neurodevelopment and has been involved in both oligodendrocyte differentiation (Collarini et al., 1992) and myelination processes (Jaegle et al., 1996). Meanwhile, CTCF is an important modulator of conformational changes in chromatin (Phillips and Corces, 2009), and seems to be a key regulator of neuronal differentiation, that is essential for neuronal diversity and functional neural networks (Hirayama et al., 2012). Rad-21 is a subunit of cohesion, which is found in at most regulatory elements (Yan et al., 2013), and also co-occurs and interacts with CTCF to regulate gene expression (Wendt et al., 2008), particularly in neurons (Guo et al., 2012; Monahan et al., 2012). Interestingly, associations have been reported between psychiatric disorders and polymorphisms in the Tst-1 binding site in the promoter region of the associated genes (Riley et al., 2010; Stopkova et al., 2004).

An association between *HTR1B* rs130058 and clinical improvement was previously reported by our group, again with heterozygotes showing a lower response (Mas et al., 2016). Because this polymorphism is also located in a TFBS, and seems to have a functional effect on gene transcription (Sun et al., 2002), we considered it interesting to analyze the three SNPs together. Only one inferred haplotype, with very low frequency, was associated with clinical response. Interestingly, the genotype combination analysis in which heterozygotes were joined showed a negative correlation with clinical improvement. Compared to patients who were homozygous for the three SNPs, lower clinical improvement was found in patients who were heterozygous for at least one of them. The lowest improvement was showed by patients who were heterozygous for the three SNPs. A complex balance has previously been reported in the regulation of *HTR1B* by functional variants located in its promoter region (Duan et al., 2003). Using reporter gen assays in human cell cultures, it has been observed that the rs130058-T and rs11568817-G alleles increase the transcriptional activity of *HTR1B* (Sun et al., 2002; Duan et al., 2003). However, an opposing effect has been described when both alleles are in the same haplotype, which

results in a lack of increased gene transcription (Duan et al., 2003). The rs11568817 SNP was previously analyzed in our sample, but although this polymorphism had an effect on clinical improvement, the result did not survive the strict correction for multiple testing applied there. Moreover, rs11568817 was not located in a TFBS, so it was not included in the haplotype or genotype combination analysis performed in the present study. Despite this, rs11568817 was in almost complete linkage disequilibrium with both associated SNPs, the rs9361233 ($r^2 = 0.9$) and the rs9361235 ($r^2 = 0.9$), which also seem to have a kind of opposing effect with rs130058. It is a curious fact that, for all associated SNPs, the heterozygotes were who showed lower clinical improvement. Although it is not frequent to observe particular traits in heterozygotes, it was also previously reported for rs11568817 and presence of certain behavioral traits (Moul et al., 2013). There was no high correlation between rs130058 and rs9361233 or rs9361235 ($r^2 \leq 0.5$), but the rs130058-TT homozygotes were necessarily rs9361233-CC and rs9361235-TT homozygotes. Moreover, the rs9361233-TT and rs9361235-CC homozygotes were also rs130058-AA homozygotes. Thus, it seems that certain haplotypes would not present in homozygosis in-vivo and only simple or multiple heterozygotes. In turn, these could have a functional effect on *HTR1B* transcriptional activity, as evidenced by the lower clinical improvement observed in these patients. This could explain the significant associations detected in the genotype combination analysis.

A negative correlation was found between the average methylation level of seven CpGs in the *HTR1B* promoter region and clinical improvement. To our knowledge, there is no previous data regarding the relationship between methylation and *HTR1B* gene expression. Given that promoter methylation generally diminishes gene expression (Szyf, 2011), one hypothesis to explain our results could be that patients with low *HTR1B* methylation levels had higher gene transcriptional activity, thereby resulting in lower serotonin levels. These patients would, therefore, be more likely to experience a higher clinical improvement when they were treated with SSRIs such as fluoxetine. The majority of studies regarding methylation in depression or antidepressant effects have been published in the last three years, and most of them have tended to follow candidate gene approaches (Januar et al., 2015). To our knowledge, this is the first time that *HTR1B* methylation has been analyzed with regard to antidepressant response. The most studied gene to date is the serotonin transporter *SLC6A4*. High methylation levels of its promoter have been shown to be associated with depression or symptoms severity (Okada et al., 2014; Olsson et al., 2010; Zhao et al., 2013), as well as with antidepressant response (Domschke et al., 2014; Okada et al., 2014). The mechanism proposed to explain this is that a hypomethylation-related increase in *SLC6A4* expression decreases serotonin availability, thereby counteracting the serotonergic effects of antidepressants. However, this would be in contrast with our hypothesis.

The role of 5-HT_{1B} receptor in the antidepressant response seems to be more complex (Carr and Lucki, 2011). While 5-HT_{1B} autoreceptor antagonists have shown to be effective in preclinical models of depression (Dawson et al., 2006; Tatarczyńska et al., 2004), the activation of 5-HT_{1B} heteroreceptors induces antidepressant-like behavior (Chenu et al., 2008). This is complicated by the fact that the distribution of 5-HT_{1B} receptors varies throughout the brain, and that different brain regions

could show differential methylation patterns. Therefore, it is more difficult to predict the influence of altered *HTR1B* expression on serotonin neurotransmission, because it can have either activating or inhibiting effects depending on the type of neuron on which it is expressed (Drago et al., 2010). Research also suggests that 5-HT_{1B} could either enhance or inhibit serotonin transmission in different parts of the brain (Watakabe et al., 2009). Interestingly, a recent study has also shown the highly complex regulation of *HTR1B* expression by its polymorphisms and the promoter methylation level regarding risk for callous-unemotional traits (Moul et al., 2015). Given that a purported mechanism of action for SSRIs involves reduction in 5-HT_{1B} mRNA levels (Anthony et al., 2000; Neumaier et al., 1996), it is plausible that epigenetic and genetic variants in *HTR1B* affect clinical improvement. Clearly, further investigation is needed to better understand the complex regulation of *HTR1B* transcriptional activity in both serotonergic and non-serotonergic synapses, and the real impact on antidepressant response.

The main limitations of the present study are the small size and the diagnostic heterogeneity of the sample. Despite being controlled as a covariant in the statistical analysis, diagnostic variability could have affected clinical outcomes. Another important limitation is that methylation levels were measured in the blood samples of patients treated with fluoxetine. In fact, all these are common limitations in other methylation studies regarding depression or antidepressant response (Januar et al., 2015). This was mitigated somehow in this study by ensuring that all patients were receiving antidepressant treatment for the first time, and that fluoxetine was the only antidepressant administered during the same period of time. Our study also benefited from the homogeneity of our cohort in terms of age, as all participants were children and adolescents.

5. Conclusion

HTR1B genetic variants located in TFBSs and the methylation level of the promoter gene region were associated with clinical improvement in children and adolescents treated with fluoxetine. These results give new evidence for the role of epigenetic and genetic factors that could modulate *HTR1B* expression in the pharmacological response to antidepressants.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpb.2016.12.003>.

Acknowledgements

This work was supported by the Alicia Koplowitz Foundation; the Spanish Ministry of Health, Instituto Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (PI041239); and FEDER-Unión Europea. Support was also given by the “Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i Recerca” (AGAUR) of the “Generalitat de Catalunya” to the “Child Psychiatry and Psychology Group” (2014 SGR 489) and to the “Clinical Pharmacology and Pharmacogenetics Group” (2014 SGR 436).

References

American Psychiatric Association, 1994. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth ed. American Psychiatric Press, Washington, DC.

Anthony, J.P., Sexton, T.J., Neumaier, J.F., 2000. Antidepressant-induced regulation of 5-HT_{1B} mRNA in rat dorsal raphe nucleus reverses rapidly after drug discontinuation. *J. Neurosci. Res.* 61 (1), 82–87.

Artigas, F., 2013. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol. Ther.* 137 (1), 119–131.

Birmaher, B., Khetarpal, S., Brent, D., Cully, M., Balach, L., Kaufman, J., Neer, S.M., 1997. The Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED): scale construction and psychometric characteristics. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 36, 545–553.

Blázquez, A., Mas, S., Plana, M.T., Lafuente, A., Lázaro, L., 2012. Fluoxetine pharmacogenetics in child and adult populations. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 21, 599–610.

Blázquez, A., Mas, S., Plana, M.T., Gassó, P., Méndez, I., Torra, M., Arnaiz, J.A., Lafuente, A., Lázaro, L., 2014. Plasma fluoxetine concentrations and clinical improvement in an adolescent sample diagnosed with major depressive disorder, obsessive-compulsive disorder, or generalized anxiety disorder. *J. Clin. Psychopharmacol.* 34, 318–326.

Carr, G.V., Lucki, I., 2011. The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. *Psychopharmacology* 213 (2–3), 265–287.

Castro, M.E., Pascual, J., Romón, T., Berciano, J., Figols, J., Pazos, A., 1998. 5-HT_{1B} receptor binding in degenerative movement disorders. *Brain Res.* 790 (1–2), 323–328.

Chenu, F., David, D.J., Leroux-Nicollet, L., Le Maître, E., Gardier, A.M., Bourin, M., 2008. Serotonin_{1B} heteroreceptor activation induces an antidepressant-like effect in mice with an alteration of the serotonergic system. *J. Psychiatry Neurosci.* 33 (6), 541–550.

Collarini, E.J., Kuhn, R., Marshall, C.J., Monuki, E.S., Lemke, G., Richardson, W.D., 1992. Down-regulation of the POU transcription factor SCIP is an early event in oligodendrocyte differentiation in vitro. *Development* 116 (1), 193–200.

Dawson, L.A., Hughes, Z.A., Starr, K.R., Storey, J.D., Bettelini, L., Bacchi, F., Arban, R., Poffe, A., Melotto, S., Hagan, J.J., Price, G.W., 2006. Characterisation of the selective 5-HT_{1B} receptor antagonist SB-616234-A (1-[6-(cis-3,5-dimethylpiperazin-1-yl)-2,3-dihydro-5-methoxyindol-1-yl]-1-[2'-methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)biphenyl-4-yl]methanone hydrochloride): in vivo neurochemical and behavioural evidence of anxiolytic/antidepressant activity. *Neuropharmacology* 50 (8), 975–983.

Domschke, K., Tidow, N., Schwarte, K., Deckert, J., Lesch, K.P., Arolt, V., Zwanzer, P., Baune, B.T., 2014. Serotonin transporter gene hypomethylation predicts impaired antidepressant treatment response. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17 (8), 1167–1176.

Drago, A., Alboni, S., Brunello, N., De Ronchi, D., Serretti, A., 2010. *HTR1B* as a risk profile maker in psychiatric disorders: a review through motivation and memory. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 66 (1), 5–27.

Duan, J., Sanders, A.R., Molen, J.E., Martinovich, L., Mowry, B.J., Levinson, D.F., Crowe, R.R., Silverman, J.M., Gejman, P.V., 2003. Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (*HTR1B*) gene affect gene expression. *Mol. Psychiatry* 8, 901–910.

Fakhoury, M., 2016. Revisiting the serotonin hypothesis: implications for major depressive disorders. *Mol. Neurobiol.* 53 (5), 2778–2786.

Foa, E.B., Coles, M., Huppert, J.D., Pasupuleti, R.V., Franklin, M.E., March, J., 2010. Development and validation of a child version of the obsessive compulsive inventory. *Behav. Ther.* 41, 121–132.

Gassó, P., Rodríguez, N., Mas, S., Pagerols, M., Blázquez, A., Plana, M.T., Torra, M., Lázaro, L., Lafuente, A., 2014. Effect of CYP2D6, CYP2C9 and ABCB1 genotypes on fluoxetine plasma concentrations and clinical improvement in children and adolescent patients. *Pharmacogenomics J.* 14, 457–462.

Guo, Y., Monahan, K., Wu, H., Gertz, J., Varley, K.E., Li, W., Myers, R.M., Maniatis, T., Wu, Q., 2012. CTCF/cohesin-mediated DNA looping is required for protocadherin α promoter choice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (51), 21081–21086.

Guy, W., 1976. ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology, Revised. United States Department of Health, Education, and Welfare, Bethesda, MD.

Hirayama, T., Tarusawa, E., Yoshimura, Y., Galjart, N., Yagi, T., 2012. CTCF is required for neural development and stochastic expression of clustered Pcdh genes in neurons. *Cell Rep.* 2 (2), 345–357.

Jaegle, M., Mandemakers, W., Broos, L., Zwart, R., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F., Meijer, D., 1996. The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation. *Science* 273 (5274), 507–510.

Januar, V., Saffery, R., Ryan, J., 2015. Epigenetics and depressive disorders: a review of current progress and future directions. *Int. J. Epidemiol.* 44 (4), 1364–1387.

Keeton, C.P., Kolos, A.C., Walkup, J.T., 2009. Pediatric generalized anxiety disorder: epidemiology, diagnosis and management. *Paediatr. Drugs* 11, 171–183.

Kovacs, M., 1992. Children's Depression Inventory Manual. Multi-Health Systems, New York.

Lenze, E.J., Dixon, D., Nowotny, P., Lotrich, F.E., Doré, P.M., Pollock, G., Hinrichs, A.L., Butters, M.A., 2013. Escitalopram reduces attentional performance in anxious older adults with high-expression genetic variants at serotonin 2A and 1B receptors. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 279–288.

Lotrich, F.E., Pollock, B.G., 2005. Candidate genes for antidepressant response to selective serotonin reuptake inhibitors. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 1, 17–35.

Luborsky, L., 1962. Clinician's judgments of mental health: a proposed scale. *Arch. Gen. Psychiatry* 7, 407–417.

Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium, Ripke, S., Wray, N.R., Lewis, C.M., Hamilton, S.P., Weissman, M.M., Breen, G., Byrne, E.M., Blackwood, D.H., Boomsma, D.I., Cichon, S., Heath, A.C., Holsboer, F., Lucae, S., Madden, P.A., Martin, N.G., McGuffin, P., Muglia, P., Nothen, M.M., Penninx, B.P., Pergadia, M.L., Potash, J.B., Rietschel, M., Lin, D., Müller-Miyshok, B., Shi, J., Steinberg, S., Grabe, H.J., Lichtenstein, P., Magnusson, P., Peris, R.H., Preisig, M., Smoller, J.W., Stefansson, K., Uher, R., Kutalik, Z., Tansey, K.E., Teumer, A., Viktorin, A., Barnes, M.R., Bettecken, T., Binder, E.B., Breuer, R., Castro, V.M., Churchill, S.E., Coryell, W.H., Craddock, N., Craig, I.W., Czamara, D., De Geus, E.J., Degenhardt, F., Farmer, A.E., Fava, M., Frank, J., Gainer, V.S., Gallagher, P.J., Gordon, S.D., Goryachev, S., Gross, M., Guipponi, M., Henders, A.K., Herms, S., Hickie, I.B., Hoefels, S., Hoogendijk, W., Hottenga, J.J., Iosifescu, D.V., Ising, M., Jones, I., Jones, L., Jung-Ying, T., Knowles, J.A., Kohane, I.S., Kohli, M.A., Korsun, A., Landen, M., Lawson, W.B., Lewis, G., Macintyre, D., Maier, W., Mattheisen, M., McGrath, P.J., McIntosh, A., McLean, A., Middeldorp, C.M., Middleton, L., Montgomery, G.M., Murphy, S.N., Nauck, M., Nolen, W.A., Nyholt, D.R., O'Donovan, M., Oskarsson, H., Pedersen, N., Scheftner, W.A., Schulz, A., Schulze, T.G., Shyn, S.I., Sigurdsson, E., Slager, S.L., Smit, J.H., Stefansson, H., Steffens, M., Thorgeirsson, T., Tozzi, F., Treutlein, J., Uhr, M., van den Oord, E.J., Van Grootheest, G., Völzke, H., Weiburg, J.B., Willemsen, G., Zitman, F.G., Neale, B., Daly, M., Levinson, D.F., Sullivan, P.F., 2013. A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol. Psychiatry* 18 (4), 497–511.

Mas, S., Pagerols, M., Gassó, P., Ortiz, A., Rodríguez, N., Morer, A., Plana, M.T., Lafuente, A., Lázaro, L., 2014. Role of GAD2 and *HTR1B* genes in early-onset obsessive-compulsive disorder: results from transmission disequilibrium study. *Genes Brain Behav.* 13 (4), 409–417.

- Mas, S., Blázquez, A., Rodríguez, N., Boloc, D., Lafuente, A., Arnaiz, J.A., Lázaro, L., Gassó, P., 2016. Pharmacogenetic study focused on fluoxetine pharmacodynamics in children and adolescent patients: impact of the serotonin pathway. *Pharmacogenet. Genomics* 26 (11), 487–496.
- Monahan, K., Rudnick, N.D., Kehayova, P.D., Pauli, F., Newberry, K.M., Myers, R.M., Maniatis, T., 2012. Role of CCCTC binding factor (CTCF) and cohesin in the generation of single-cell diversity of protocadherin- α gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (23), 9125–9130.
- Moul, C., Dobson-Stone, C., Brennan, J., Hawes, D., Dadds, M., 2013. An exploration of the serotonin system in antisocial boys with high levels of callous-unemotional traits. *PLoS One* 8 (2), e56619.
- Moul, C., Dobson-Stone, C., Brennan, J., Hawes, D.J., Dadds, M.R., 2015. Serotonin 1B receptor Gene (HTR1B) methylation as a risk factor for callous-unemotional traits in antisocial boys. *PLoS One* 10 (5), e0126903.
- Neumaier, J.F., Root, D.C., Hamblin, M.W., 1996. Chronic fluoxetine reduces serotonin transporter mRNA and 5-HT1B mRNA in a sequential manner in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 15 (5), 515–522.
- Okada, S., Morinobu, S., Fuchikami, M., Segawa, M., Yokomaku, K., Kataoka, T., Okamoto, Y., Yamawaki, S., Inoue, T., Kusumi, I., Koyama, T., Tsuchiyama, K., Terao, T., Kokubo, Y., Mimura, M., 2014. The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. *J. Psychiatr. Res.* 53, 47–53.
- Olsson, C.A., Foley, D.L., Parkinson-Bates, M., Byrnes, G., McKenzie, M., Patton, G.C., Morley, R., Anney, R.J., Craig, J.M., Saffery, R., 2010. Prospects for epigenetic research within cohort studies of psychological disorder: a pilot investigation of a peripheral cell marker of epigenetic risk for depression. *Biol. Psychol.* 83 (2), 159–165.
- Perroud, N., Bondolfi, G., Uher, R., Gex-Fabry, M., Aubry, J.M., Bertschy, G., Malafosse, A., Kosel, M., 2011. Clinical and genetic correlates of suicidal ideation during antidepressant treatment in a depressed outpatient sample. *Pharmacogenomics* 12, 365–377.
- Phillips, J.E., Corces, V.G., 2009. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137 (7), 1194–1211.
- Riley, B., Thiselton, D., Maher, B.S., Bigdeli, T., Wormley, B., McMichael, G.O., Fanous, A.H., Vladimirov, V., O'Neill, F.A., Walsh, D., Kendler, K.S., 2010. Replication of association between schizophrenia and ZNF804A in the Irish Case-Control Study of Schizophrenia sample. *Mol. Psychiatry* 15 (1), 29–37.
- Ruf, B.M., Bhagwagar, Z., 2009. The 5-HT1B receptor: a novel target for the pathophysiology of depression. *Curr. Drug Targets* 10 (11), 1118–1138.
- Sanders, A.R., Duan, J., Gejman, P.V., 2002. DNA variation and psychopharmacology of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. *Pharmacogenomics* 3, 745–762.
- Sari, Y., 2004. Serotonin1B receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28 (6), 565–582.
- Shaffer, D., Gould, M.S., Brasic, J., Ambrosini, P., Fisher, P., Bird, H., Aluwahlia, S., 1983. A children's global assessment scale (CGAS). *Arch. Gen. Psychiatry* 40, 1228–1231.
- Shanahan, N.A., Velez, L.P., Masten, V.L., Dulawa, S.C., 2011. Essential role for orbitofrontal serotonin 1B receptors in obsessive-compulsive disorder-like behavior and serotonin reuptake inhibitor response in mice. *Biol. Psychiatry* 70 (11), 1039–1048.
- Stopkova, P., Saito, T., Papolos, D.F., Vevera, J., Pacht, I., Zukov, I., Berson, Y.B., Margolis, B.A., Strous, R.D., Lachman, H.M., 2004. Identification of PIK3C3 promoter variant associated with bipolar disorder and schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 55 (10), 981–988.
- Sun, H.F., Chang, Y.T., Fann, C.S., Chang, C.J., Chen, Y.H., Hsu, Y.P., Yu, W.Y., Cheng, A.T., 2002. Association study of novel human serotonin 5-HT(1B) polymorphisms with alcohol dependence in Taiwanese Han. *Biol. Psychiatry* 51, 896–901.
- Szyf, M., 2011. DNA methylation, the early-life social environment and behavioral disorders. *J. Neurodev. Disord.* 3 (3), 238–249.
- Tatarczyńska, E., Kłodzińska, A., Stachowicz, K., Chojnacka-Wójcik, E., 2004. Effect of combined administration of 5-HT1A or 5-HT1B/1D receptor antagonists and antidepressants in the forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.* 487 (1–3), 133–142.
- Tost, J., Gut, I.G., 2007. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat. Protoc.* 2 (2007), 2265–2275.
- Usala, T., Clavenna, A., Zuddas, A., Bonati, M., 2008. Randomised controlled trials of selective serotonin reuptake inhibitors in treating depression in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 18, 62–73.
- Watakabe, A., Komatsu, Y., Sadakane, O., Shimegi, S., Takahata, T., Higo, N., Tochitani, S., Hashikawa, T., Naito, T., Osaki, H., Sakamoto, H., Okamoto, M., Ishikawa, A., Hara, S., Akasaki, T., Sato, H., Yamamori, T., 2009. Enriched expression of serotonin 1B and 2A receptor genes in macaque visual cortex and their bidirectional modulatory effects on neuronal responses. *Cereb. Cortex* 19 (8), 1915–1928.
- Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishihiro, T., Yahata, K., Imamoto, F., Aburatani, H., Nakao, M., Imamoto, N., Maeshima, K., Shirahige, K., Peters, J.M., 2008. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 451 (7180), 796–801.
- Wilens, T.E., Cohen, L., Biederman, J., Abrams, A., Neff, D., Faraone, S.V., 2002. Fluoxetine pharmacokinetics in pediatric patients. *J. Clin. Psychopharmacol.* 22, 568–575.
- Yan, J., Enge, M., Whittington, T., Dave, K., Liu, J., Sur, I., Schmierer, B., Jolma, A., Kivioja, T., Taipale, M., Taipale, J., 2013. Transcription factor binding in human cells occurs in dense clusters formed around cohesin anchor sites. *Cell* 154 (4), 801–813.
- Zhao, J., Goldberg, J., Bremner, J.D., Vaccarino, V., 2013. Association between promoter methylation of serotonin transporter gene and depressive symptoms: a monozygotic twin study. *Psychosom. Med.* 75 (6), 523–529.
- Zhuang, X., Gross, C., Santarelli, L., Compan, V., Trillat, A.C., Hen, R., 1999. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors. *Neuropsychopharmacology* 21 (2 Suppl), 52S–60S.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Information regarding clinical scales administered

The CDI evaluates the presence and severity of specific depressive symptoms in youth. It contains 27 items, each scored from 0 to 2. Depressed children were defined as those with a self-reported CDI score ≥ 19 (Kovacs, 1992).

The OCI-CV is a 21-item self-reported measure of obsessive and/or compulsive symptoms for use in youth aged 7-17 years. For each item the child is asked to report the frequency of the emotion or behavior on a 3-point scale (0 = never, 2 = frequently). Scores ≥ 17 are considered as indicating the presence of obsessive and/or compulsive symptoms (Foa et al., 2010).

The SCARED is a 41-item self-report instrument used to screen for childhood anxiety. For each item the child is asked to report the frequency of the emotion or behavior using a 3-point scale (0 = not true or hardly ever true, 2 = very true or often true). The SCARED yields scores on five subscales (somatic problems, general anxiety, separation anxiety, social phobia, and school phobia), and the sum of all item responses gives a total anxiety score. A total anxiety score ≥ 25 serves as a cut-off point for the diagnosis of an anxiety disorder (Birmaher et al., 1997).

The GAF/CGAS scales are clinician-administered instruments used to assess both symptom severity and psychosocial functioning. They are numerical scales with a range of scores from 1 to 100, with scores above 70 being considered as in the normal range (Luborsky, 1962; Shaffer et al., 1983). In the present study the CGAS was administered to subjects under 12 years of age.

The CGI-S (Guy, 1976) assesses the severity of global symptomatology on a scale of 1 (normal, not at all ill) to 7 (extremely ill); and the CGI-I (Guy, 1976) assesses the adequacy of clinical response since the start of treatment and is also rated on a 7-point scale as follows: 1=very much improved, 2=much improved, 3=minimally improved, 4=no change from baseline, 5=minimally worse, 6=much worse, and 7=very much worse.

Table S1. Clinical improvement experienced by patients diagnosed with MDD, OCD, or GAD.

	dCDI ¹ (Mean ± SD)	dOCI-CV ² (Mean ± SD)	dSCARED (Mean ± SD)	dGAF/CGAS ³ (Mean ± SD)	dCGI-S (Mean ± SD)	CGI-I (Mean ± SD)
MDD	10.5 ± 7.9	3.7 ± 7.2	5.0 ± 14.1	19.4 ± 14.9	1.7 ± 1.2	2.7 ± 1.2
OCD	5.7 ± 8.9	3.1 ± 5.5	2.8 ± 10.3	11.2 ± 8.8	1.2 ± 0.8	3.1 ± 0.9
GAD	5.6 ± 4.7	-0.8 ± 4.0	7.2 ± 11.5	20 ± 13.3	1.3 ± 0.7	2.6 ± 1.3

¹P = 0.021 (MDD vs OCD); ² P = 0.019 (MDD vs GAD); ³P = 0.035 (MDD vs OCD).

Abbreviations: CDI, Children's Depression Inventory; CGI-I, Clinical Global Impression-Improvement scale; CGI-S, Clinical Global Impression-Severity scale; GAD, Generalized Anxiety Disorder; GAF/CGAS, Global Assessment of Functioning scale/Children's Global Assessment Scale; MDD, Major Depression Disorder; OCD, Obsessive Compulsive Disorder; OCI-CV, Obsessive Compulsive Inventory-Child Version; SCARED, Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders.

Table S2. Significant results of the genetic association analysis between the associated SNPs and clinical improvement.

rs9361233 and CGI-I	N	Mean	SE	Dif	Lower	Upper	P-value	AIC
Codominant								
C/C	29	2.55	0.19	0.00			0.0058	251.1
C/T	29	3.28	0.23	0.71	0.13	1.30		
T/T	21	2.29	0.24	-0.26	-0.90	0.37		
Dominant								
C/C	29	2.55	0.19	0.00				
C/T-T/T	50	2.86	0.18	0.30	-0.24	0.85	0.2750	258.1
Recessive								
C/C-C/T	58	2.91	0.16	0.00				
T/T	21	2.87	0.24	-0.62	-1.20	0.03	0.0387	255.0
Overdominant								
C/C-T/T	50	2.44	0.15	0.00				
C/T	29	3.28	0.23	0.82	0.30	1.34	0.0018	249.8
Log-Additive								
0, 1, 2				-0.08	-0.41	0.26	0.6429	259.1
rs9361235 and OCI-CV								
Codominant								
T/T	27	4.26	1.19	0.00			0.0026	494.4
T/C	30	0.40	1.17	-4.06	-6.92	-1.19		
C/C	21	5.05	1.47	0.76	-2.38	3.91		
Dominant								
T/T	27	4.26	1.19	0.00				
T/C-C/C	51	2.31	0.96	-2.06	-4.78	0.65	0.1360	501.9
Recessive								
T/T-T/C	57	2.23	0.87	0.00				
C/C	21	5.05	1.47	2.89	0.013	5.77	0.0489	500.2
Overdominant								
T/T-C/C	48	4.60	0.92	0.00				
T/C	30	0.40	1.17	-4.39	-6.89	-1.89	0.0006	492.6
Log-Additive								
0, 1, 2				0.17	-1.51	1.84	0.8449	504.1
rs9361235 and CGI-I								
Codominant								
T/T	27	2.52	0.20	0.00			0.0056	251.0
T/C	31	3.26	0.21	0.72	0.13	1.31		
C/C	21	2.29	0.24	-0.24	-0.88	0.41		
Dominant								
T/T	27	2.52	0.20	0.00			0.2422	257.9
T/C-C/C	52	2.86	0.17	0.33	-0.22	0.88		
Recessive								
T/T-T/C	58	2.91	0.16	0.0			0.0380	254.9
C/C	21	2.29	0.24	-0.62	-1.20	-0.03		
Overdominant								
T/T-C/C	48	2.42	0.15	0.00			0.0016	249.6
T/C	31	3.26	0.22	0.82	0.31	1.34		
Log-Additive								
0, 1, 2				-0.08	-0.42	0.26	0.6604	259.2

Table S3. Haplotype association analysis (rs9361233-rs130058-rs9361235) with clinical improvement. The most frequent haplotype (TAC) is used as the reference haplotype for comparisons.

Haplotype	Frequency	CDI			OCI-CV			SCARED		
		Difference	CI (95%)	P-value	Difference	CI (95%)	P-value	Difference	CI (95%)	P-value
TAC	0.43	4.44			-0.86			-4.94		
CIT	0.37	-0.01	(-2.25 - 2.24)	n.s.	-0.17	(-1.76 - 1.43)	n.s.	-2.15	(-5.70 - 1.40)	n.s.
CAT	0.16	1.98	(-1.31 - 5.27)	n.s.	-0.8	(-3.14 - 1.53)	n.s.	-3.25	(-8.44 - 1.93)	n.s.
CAC	0.13	-5.46	(-19.50 - 8.58)	n.s.	2.04	(-6.84 - 10.92)	n.s.	-4.18	(-24.15 - 15.78)	n.s.
TAT	≤0.01	-15.05	(-28.68 - -1.42)	0.03	-17.52	(-26.23 - -8.80)	0.0001	-26.62	(-46.33 - -6.91)	0.008
TTC	≤0.01	6.79	(-7.25 - 20.84)	n.s.	-2.92	(-12.71 - 6.87)	n.s.	-4.56	(-28.32 - 19.20)	n.s.
CTC	≤0.01	-6.79	(-26.22 - 12.65)	n.s.	-6.63	(-16.86 - 3.61)	n.s.	-13.72	(-37.53 - 10.09)	n.s.
GAF/CGAS										
CGI-S										
CGI-I										
Haplotype	Frequency	Difference	CI (95%)	P-value	Difference	CI (95%)	P-value	Difference	CI (95%)	P-value
TAC	0.43	61.04			1.83			2.15		
CIT	0.37	-0.4	(-3.51 - 2.71)	n.s.	0.03	(-0.33 - 0.40)	n.s.	0.18	(-0.21 - 0.57)	n.s.
CAT	0.16	1.52	(-2.94 - 5.98)	n.s.	0.06	(-0.48 - 0.59)	n.s.	-0.18	(-0.74 - 0.38)	n.s.
CAC	0.13	-4.44	(-24.93 - 16.05)	n.s.	-0.21	(-2.57 - 2.15)	n.s.	0.14	(-2.36 - 2.64)	n.s.
TAT	≤0.01	-12.48	(-32.03 - 7.07)	n.s.	0.33	(-2.00 - 2.67)	n.s.	0.48	(-1.99 - 2.95)	n.s.
TTC	≤0.01	14.67	(-4.98 - 34.33)	n.s.	-0.73	(-2.94 - 1.48)	n.s.	-0.63	(-3.07 - 1.82)	n.s.
CTC	≤0.01	-8.06	(-36.19 - 20.07)	n.s.	-0.48	(-3.81 - 2.84)	n.s.	0.31	(-3.22 - 3.83)	n.s.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

En la presente tesis nos hemos centrado en profundizar en las bases biológicas del TOC de inicio en la infancia y la adolescencia, concretamente en los mecanismos inmunopatogénicos implicados en el trastorno, así como en identificar marcadores genéticos de la respuesta al principal tratamiento farmacológico usado en estos pacientes, la fluoxetina. Los resultados obtenidos respaldan las hipótesis planteadas al inicio de este estudio.

Los hallazgos derivados de los *estudios 1 y 2* sugieren la participación de mecanismos inmunitarios en la fisiopatología del TOC de inicio temprano. Concretamente, parece existir una susceptibilidad genética basada en la presencia de determinados alelos HLA de clase II así como una predisposición inflamatoria en los monocitos de pacientes con TOC de inicio en la infancia y la adolescencia, determinada por una alteración de la distribución de las distintas subpoblaciones de monocitos, una sobre-activación de éstos en respuesta a la estimulación inmunitaria y una modificación de sus perfiles de expresión génica. Estas evidencias confirman, por tanto, la primera hipótesis de esta tesis.

Los resultados obtenidos en los estudios de farmacogenética proporcionan nuevas evidencias sobre el papel de factores genéticos y epigenéticos relacionados con el mecanismo de acción de la fluoxetina en la respuesta clínica al tratamiento con dicho fármaco en niños y adolescentes, confirmándose así la segunda hipótesis de la presente tesis. Concretamente, a pesar de haber explorado una gran variedad de genes candidatos pertenecientes a distintas vías biológicas, nuestros hallazgos muestran una influencia de genes directamente relacionados con el sistema serotoninérgico, específicamente *HTR1B* y *TPH2*, en la respuesta terapéutica.

En los siguientes apartados se llevará a cabo una discusión detallada de los resultados obtenidos en los distintos estudios que conforman la presente tesis doctoral.

5.1 Desregulación inmunológica en el TOC de inicio en la infancia y la adolescencia

En el *estudio 1* se observó que los pacientes con TOC presentaban una frecuencia significativamente superior de los alelos *HLA-DRB1*04* que definen el serotipo HLA-DR4 en comparación con la muestra

de referencia. Este gen codifica para la cadena beta de la molécula HLA-DR, una molécula HLA de clase II. Las moléculas HLA de clase II son glicoproteínas transmembrana que juegan un papel clave en el funcionamiento del sistema inmunitario gracias a su participación en la presentación de los antígenos, tanto propios como exógenos, por parte de las células presentadoras de antígenos (monocitos, macrófagos y células dendríticas, entre otras) a las células T. La presencia de determinados alelos en el gen *HLA-DRB1*, por tanto, podría condicionar la aparición de una respuesta inmunitaria más acentuada en presencia de agentes infecciosos y otros estímulos inflamatorios. En este sentido, el serotipo DR4 asociado en nuestro estudio con el TOC resulta especialmente interesante debido a que los alelos del gen *HLA-DRB1* que lo conforman han sido asociados en numerosas ocasiones con el riesgo de padecer enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la artritis reumatoide o la diabetes de tipo 1 (Miyadera and Tokunaga, 2015). Además, estos alelos han sido asociados previamente con otros trastornos neuropsiquiátricos como el TEA. Así, se ha descrito que la frecuencia de determinados alelos pertenecientes a este serotipo podría ser más elevada en los pacientes con TEA que en los sujetos control (Lee et al., 2006; Torres et al., 2002; Warren et al., 1996). Dado que estos pacientes llevan a cabo una serie de comportamientos ritualizados y repetitivos, como el orden, la organización, el contaje o el golpeteo, similares a los observados en individuos con TOC, y que a menudo resultan difíciles de diferenciar de las obsesiones y compulsiones características de esta enfermedad, no es de extrañar que ambos trastornos compartan algunos de los factores de riesgo. De hecho, un estudio reciente de tipo GWAS en una población de pacientes con diagnóstico de TOC o de TEA reveló la existencia de una relación genética entre ambos trastornos (Guo et al., 2017).

En cuanto al *estudio 2*, los resultados mostraron que, en comparación con los individuos control, los pacientes con TOC presentaban un incremento en el porcentaje de monocitos totales así como de monocitos proinflamatorios, tanto intermedios como no clásicos. Asimismo, se observó que, los monocitos cultivados de estos pacientes presentaban una respuesta más acentuada a la estimulación con LPS, con una mayor secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, GM-CSF, TNF- α e IL-8), en comparación con los sujetos control.

A pesar de que no existen evidencias previas sobre la desregulación de los monocitos en pacientes con TOC, diversos estudios han demostrado que estas alteraciones podrían estar implicadas en la etiopatogenia de otros trastornos psiquiátricos. Así, diversos investigadores han identificado niveles superiores de monocitos totales en trastornos relacionados con esta enfermedad como el ST (Matz et al., 2012) o el TEA (Denney et al., 1996; Sweeten et al., 2003). Con respecto a las poblaciones de

monocitos, los resultados obtenidos en la presente tesis constituyen la primera evidencia de disregulación en pacientes con TOC o con otros trastornos relacionados.

Por lo que respecta a la producción de citoquinas, nuestros hallazgos parecen ser contrarios a los resultados obtenidos en estudios previos en los cuales se observó que la producción de citoquinas *in vitro* en los pacientes con TOC en respuesta a la estimulación con LPS era igual o inferior a la detectada en los individuos control (Denys et al., 2006, 2004, Fluitman et al., 2010a, 2010b). No obstante, es importante remarcar que en estos estudios se utilizaron muestras biológicas que incluían distintos tipos de células inmunitarias, y no únicamente monocitos, y que además todos ellos se llevaron a cabo en pacientes de edad adulta en los cuales la producción de citoquinas parece ser distinta a la observada en niños (Lilic et al., 1997). Además, mientras que nuestro estudio se llevó a cabo en pacientes con TOC de inicio temprano, en los estudios previos no se evaluaron las posibles diferencias entre estos individuos y los de inicio tardío, a pesar de que se ha descrito que los mecanismos etiopatogénicos entre ambos grupos podrían ser distintos (Dell’Osso et al., 2016; Taylor, 2011). En efecto, Konuk y colaboradores identificaron que los niveles de TNF- α en plasma eran significativamente más elevados en pacientes con TOC de inicio temprano que en los de inicio tardío (Konuk et al., 2007), lo cual podría estar de acuerdo con los resultados obtenidos en la presente tesis. Además, otros estudios han descrito también niveles incrementados de determinadas citoquinas con actividad proinflamatoria, como el TNF- α , la IL-1 β o la IL-6, en el plasma de pacientes con TOC en comparación con individuos control (Gray and Bloch, 2012; Konuk et al., 2007; Rao et al., 2015; Şimşek et al., 2016).

En este estudio se observó también que el tratamiento farmacológico con antidepresivos parece tener un efecto sobre los parámetros inmunológicos analizados, de manera que los pacientes tratados presentaron un perfil proinflamatorio inferior al de los pacientes no tratados y superior al de los controles sanos. Estos resultados concuerdan con evidencias previas que han sugerido que el tratamiento con fármacos antidepresivos podría tener propiedades antiinflamatorias (Caiaffo et al., 2016; Maes, 2001). No obstante, el análisis *post-hoc* no permitió detectar diferencias significativas entre los pacientes tratados y los no tratados, probablemente debido a la limitación en el tamaño de la muestra, especialmente en el grupo de niños no tratados. En caso de que estudios posteriores confirmaran la tendencia identificada en este trabajo, el tratamiento combinado de antidepresivos junto con fármacos antiinflamatorios como los glucocorticoides podría constituir una terapia prometedora para la mejora de la sintomatología obsesivo-compulsiva, tal y como se ha observado en pacientes con un diagnóstico de TDM o de esquizofrenia (Keller et al., 2013; Na et al., 2014).

Los resultados obtenidos en el estudio de *microarrays* (pendientes de ser publicados) concuerdan con los hallazgos identificados en los estudios previos incluidos en la presente tesis. Así, se observaron diferencias de expresión génica significativas entre los cultivos primarios de monocitos de pacientes con TOC y los de los sujetos control, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con LPS. En ambos casos, los genes diferencialmente expresados participaban en distintos procesos biológicos relacionados con la regulación del sistema inmunitario. Los principales procesos afectados en condiciones basales hacían referencia a la presentación y el procesamiento de antígenos, reforzando así los resultados obtenidos en el *estudio 1*. Tras la estimulación con LPS, los genes diferencialmente expresados indicaron una desregulación de la respuesta inflamatoria y de la producción de citoquinas. Estos datos refuerzan, por tanto, los resultados obtenidos en el *estudio 2*. A pesar de que es la primera vez que se lleva a cabo una exploración sobre las posibles alteraciones en la expresión génica de monocitos en el TOC, estudios previos han demostrado que estas células presentan un perfil de expresión distinto, con una expresión aberrante de genes relacionados con la inflamación y la adhesión celular, en pacientes con esquizofrenia y trastorno bipolar (Drexhage et al., 2010; Padmos et al., 2008).

En conjunto, nuestros hallazgos sugieren la participación de mecanismos inmunitarios en la etiopatogenia del TOC. Concretamente, parece existir una predisposición proinflamatoria en condiciones fisiológicas y una hiperactivación en respuesta a estímulos inmunitarios en los monocitos cultivados de estos pacientes. Estas células y las citoquinas que liberan a nivel periférico son capaces de penetrar en el cerebro tras la exposición a estrés psicosocial (Wohleb et al., 2015) o cuando se produce un daño intenso o prolongado en el cerebro (London et al., 2013), contribuyendo así a la respuesta inflamatoria y afectando a la función cerebral y a los procesos de neurodesarrollo (Doherty, 2007). Así, se ha descrito que las citoquinas proinflamatorias son capaces de reducir la disponibilidad de neurotransmisores como la serotonina, la dopamina o la noradrenalina debido a una disminución de la síntesis y liberación de los neurotransmisores así como al aumento de su recaptación (Felger and Lotrich, 2013). Se ha observado, por ejemplo, que citoquinas como la IL-1 β o el TNF- α estimulan la transcripción y aumentan la actividad del transportador de serotonina (SERT), responsable de la recaptación del neurotransmisor. Además, la activación inflamatoria con LPS parece provocar una rápida estimulación de la actividad del transportador SERT en cerebros de ratón así como un aumento de la eliminación cerebral de serotonina (Baganz and Blakely, 2013; Dunn, 2006). En consecuencia, se produce una disminución de los niveles de este neurotransmisor en el espacio sináptico. Estas citoquinas parecen provocar también un aumento de la excitotoxicidad glutamatérgica. Por otro lado, el TNF- α ha demostrado ser capaz de regular la diferenciación y la

apoptosis de neuronas dopaminérgicas durante determinados periodos del desarrollo embrionario (Doherty, 2007). Dichos cambios afectan principalmente a estructuras de los ganglios basales y del córtex cingulado anterior dorsal (Miller et al., 2013), estructuras implicadas en la fisiopatología del TOC, tal y como se ha comentado anteriormente (Pauls et al., 2014). Así, la activación de los monocitos en respuesta a estímulos inmunitarios y otros posibles estresores en individuos con una susceptibilidad genética podría estar implicada en el inicio, la progresión o la exacerbación de la sintomatología obsesivo-compulsiva, tal y como se ha propuesto para otras enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia (Benros et al., 2012; Bergink et al., 2014), la depresión (Miller et al., 2009) o la ansiedad (Furtado and Katzman, 2015).

Además, la activación observada en los cultivos primarios de monocitos de estos pacientes podría sugerir una posible activación de la microglía, derivada también de la línea mieloide, a nivel central, ya que ambos tipos celulares parecen exhibir respuestas similares a estímulos sistémicos (Prinz and Priller, 2014; Takahashi et al., 2016). Asimismo, dado que las células de la microglía son las únicas células del cerebro capaces de expresar los genes HLA de clase II en el periodo postnatal, la presencia de determinados alelos en el gen *HLA-DRB1* o de alteraciones en la expresión de estas moléculas, como los identificados en la presente tesis, podría condicionar la funcionalidad de estas células, reforzando así la hipótesis sobre una posible desregulación de la microglía en el TOC. A pesar de que el papel de estas células en la etiopatogenia de esta enfermedad no se ha estudiado previamente, diversas evidencias sugieren la participación de una desregulación de la microglía en trastornos relacionados con el TOC. Así, los estudios de neuroimagen *in vivo* han demostrado la existencia de una activación excesiva de la microglía en regiones específicas implicadas en enfermedades psiquiátricas como el córtex anterior cingulado y el cerebelo en pacientes con TEA (Suzuki et al., 2013) o en los ganglios basales de pacientes con PANDAS o con ST (Kumar et al., 2015). Además, en estudios *post-mortem* centrados en evaluar la expresión génica en los ganglios basales de pacientes con ST se identificó un aumento de la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), liberada por la microglía activada y capaz de promover el reclutamiento de monocitos en el SNC (Morer et al., 2010). Asimismo, el estudio de la expresión a nivel de todo el genoma en los ganglios basales de estos pacientes mostró una sobreexpresión de diversos genes relacionados con la microglía (Lenington et al., 2016), lo cual indica un aumento de la proliferación y de la activación de estas células en los pacientes con ST. Curiosamente, algunos de los genes identificados en el estudio de Lenington y colaboradores se encontraron diferencialmente expresados en los monocitos cultivados de nuestra población de TOC, tanto en condiciones basales (30 genes) como tras la estimulación con LPS (12 genes).

Por otro lado, diversos estudios llevados a cabo en modelos animales de TOC y trastornos relacionados, como el ST o el TEA, apuntan también a una desregulación de la microglía como parte de los mecanismos etiopatogénicos de estas enfermedades (Frick and Pittenger, 2016). Así, los ratones *knockout* para el gen *Hoxb8* exhiben un comportamiento de acicalamiento excesivo acompañado de síntomas de ansiedad y de alteraciones en la conducta social, todas ellas manifestaciones relacionadas con el TOC (Chen et al., 2010; Greer and Capecchi, 2002; Nagarajan et al., 2017a). Este gen codifica para un factor de transcripción homeobox expresado en células hematopoyéticas de la línea mieloide y con funciones tanto a nivel periférico como del SNC, donde únicamente se encuentra expresado en una subpoblación de células de la microglía. Se ha descrito que el fenotipo observado en estos ratones podría ser debido a una reducción en el número de células de la microglía y una alteración de su funcionalidad (Chen et al., 2010; Greer and Capecchi, 2002) que acaba provocando una modulación aberrante de las sinapsis y de la neurotransmisión a nivel del circuito corticoestriatal (Nagarajan et al., 2017b). Asimismo, se ha descrito que los ratones *knockout* para el gen *Hdc*, que codifica para la histidina descarboxilasa, presentan alteraciones en el comportamiento similares a las observadas en pacientes con ST. Esta enzima está implicada en la síntesis de histamina, que participa en la regulación de la neurotransmisión y de los procesos inmunitarios. Frick y colaboradores observaron que estos ratones presentaban un número reducido de un subtipo de células de la microglía con función neuroprotectora mientras que tras la estimulación inflamatoria con LPS se producía una sobreactivación de la microglía a nivel del estriado (Frick et al., 2016). Finalmente, cabe destacar los resultados obtenidos en ratones BTBR *T+tf/J*, que exhiben una interacción social reducida y un comportamiento repetitivo y estereotipado que sirve como modelo de TEA. Se ha observado que estos ratones presentan un incremento en el número de células de la microglía que expresan genes MHC de clase II en comparación con los ratones control, lo que sugiere un elevado estado de activación de estas células (Heo et al., 2011).

En resumen, los resultados obtenidos en nuestros estudios proporcionan nuevas evidencias sobre el papel de las alteraciones en el sistema inmunitario en la fisiopatología del TOC de inicio en la infancia y la adolescencia. Concretamente, se demuestra la existencia de factores genéticos relacionados con el sistema inmunitario que confieren cierta susceptibilidad a padecer el trastorno así como de un fenotipo proinflamatorio en los monocitos de los pacientes con TOC. Además, los hallazgos identificados en la presente tesis podrían sugerir la posible participación de la desregulación de la microglía en la etiopatogenia de este trastorno. Estas evidencias abren la posibilidad al desarrollo de una nueva estrategia farmacológica, basada en el uso de fármacos antiinflamatorios en combinación con los antidepresivos, para un tratamiento más efectivo del TOC.

No obstante, es necesario llevar a cabo más estudios que permitan esclarecer el papel que ejercen las alteraciones del sistema inmunitario en la fisiopatología del TOC y la utilidad de los fármacos antiinflamatorios en la mejora de la sintomatología obsesivo-compulsiva.

5.2 Marcadores genéticos y epigenéticos de la respuesta clínica a fluoxetina en niños y adolescentes

En los *estudios 3 y 4* se pretendía evaluar la influencia de las variantes genéticas en genes relacionados con la farmacodinamia de la fluoxetina en la respuesta terapéutica en niños y adolescentes. En una primera evaluación se analizaron un total de 316 SNPs distribuidos a lo largo de 45 genes candidatos implicados en diferentes vías biológicas relacionadas directa o indirectamente con el mecanismo de acción del fármaco. Los resultados obtenidos mostraron una asociación entre el polimorfismo rs130058 del gen *HTR1B* y la respuesta terapéutica. En consecuencia, se realizó un análisis secundario incluyendo 63 SNPs en 9 genes candidatos relacionados con el sistema serotoninérgico que permitió identificar un polimorfismo del gen *TPH2* (rs4570625) asociado también con la mejoría clínica.

El gen *HTR1B* codifica para el receptor 1B de la serotonina, un receptor presináptico relacionado con la liberación del neurotransmisor. Este receptor parece estar implicado en la patogénesis del TOC y de otras enfermedades neuropsiquiátricas, como el TDM, así como en los efectos farmacológicos de los ISRSs (Huang et al., 2003; Perroud et al., 2011; Shanahan et al., 2011; Tsai et al., 2004). Así, se ha observado que la activación de este receptor en el córtex orbitofrontal de ratones induce la aparición de comportamientos obsesivo-compulsivos mientras que el uso de antagonistas o de ISRSs provoca una reducción de esta sintomatología probablemente como consecuencia de la desensibilización de este receptor (Ho et al., 2016; Shanahan et al., 2011). Otros estudios han demostrado que los ratones *knockout* para este gen muestran una variedad de cambios en el comportamiento como una disminución de la ansiedad o de la impulsividad (Sanders et al., 2002) y, además, algunos de los efectos ejercidos por los fármacos antidepresivos parecen no producirse en estos animales (Lotrich and Pollock, 2005). Las variantes genéticas de este gen han sido asociadas previamente tanto con la etiopatogenia del TOC (Gassó et al., 2015; Mas et al., 2014; Ortiz et al., 2015) como con los efectos del tratamiento antidepresivo (Lenze et al., 2013; Perroud et al., 2011). En el *estudio 3* identificamos que los individuos heterocigotos para el polimorfismo rs130058 presentaban una peor respuesta terapéutica al tratamiento con fluoxetina. Este SNP se localiza en la

región promotora del gen, concretamente en un TFBS, por lo que podría alterar la capacidad de unión del factor de transcripción ARP1, alterando así la actividad transcripcional. De hecho, se ha descrito que este polimorfismo es capaz de modificar los niveles de expresión genética en diferentes líneas celulares (Sun et al., 2002), entre ellas las neuronas corticales humanas (Duan et al., 2003). Así, mediante el uso de ensayos con un gen reportero en cultivos celulares humanos, se observó que tanto el alelo rs130058-T como el alelo rs11568817-G, localizado cerca (100 pb) de la primera variante, aumentaban la actividad transcripcional de *HTR1B* (Duan et al., 2003; Sun et al., 2002). Sin embargo, cuando los dos alelos se encuentran formando parte del mismo haplotipo el efecto observado parece ser opuesto, provocando una reducción en la transcripción génica (Duan et al., 2003), lo cual pone de manifiesto la elevada complejidad existente en la regulación de la expresión de este gen. En nuestro estudio, de manera similar a lo observado con el rs130058, los individuos heterocigotos para el rs11568817 parecían presentar también una menor respuesta terapéutica (OCI: $p=0.001$; SCARED: $p=0.01$; CGI-I: $p=0.0005$), a pesar de que los resultados obtenidos no fueron significativos tras las estrictas correcciones aplicadas. Estos hallazgos nos llevaron a evaluar en mayor profundidad otros factores genéticos y epigenéticos de *HTR1B* que pudieran participar en la compleja regulación de la expresión del gen, afectando en última instancia a la respuesta clínica del paciente tras el tratamiento farmacológico. Así, en el *estudio 4* analizamos el efecto de otros tres polimorfismos que estaban en desequilibrio de ligamiento con el SNP identificado en el análisis primario (rs130058) y que se localizaban en TFBSs, por lo que podrían estar implicados en la regulación de la actividad transcripcional del gen. Los resultados mostraron dos variantes más (rs9361233 y rs9361235) que se encontraban asociadas con la mejoría clínica observada en los pacientes tratados con fluoxetina. Cabe destacar que es la primera vez que se evalúa el efecto de estos dos polimorfismos en la respuesta terapéutica a antidepresivos. Debido a su localización en regiones reguladoras del gen, concretamente en TFBSs de la región 3' UTR (rs9361233) y de la región 5' *upstream* (rs9361235), estas variantes podrían alterar la capacidad de unión de tres factores de transcripción distintos expresados a nivel neuronal (TST1, Rad21 y CTCF). Curiosamente, para estos dos polimorfismos se observó también que los individuos con un genotipo heterocigoto presentaban una peor respuesta terapéutica. A pesar de que el análisis haplotípico no mostró asociaciones significativas relevantes, el análisis conjunto de los genotipos heterocigotos para los tres polimorfismos asociados a nivel individual con la respuesta terapéutica mostró una correlación negativa con la mejoría clínica. Así, en comparación con los pacientes homocigotos para los tres SNPs, los individuos heterocigotos para al menos uno de ellos presentaron una peor respuesta terapéutica, observándose la menor mejoría clínica en los pacientes heterocigotos para las tres

variantes. Estos resultados refuerzan la elevada complejidad de los mecanismos de regulación de la expresión del gen *HTR1B*.

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis del grado de metilación del promotor del gen *HTR1B*. Los resultados obtenidos indicaron la existencia de una correlación negativa entre el nivel de metilación medio de los siete lugares CpGs incluidos en la región analizada y la mejoría clínica, de manera que los individuos con bajos niveles de metilación presentaban una mayor respuesta terapéutica. A pesar de que no existen evidencias previas sobre los efectos de la metilación en el gen *HTR1B* en su actividad transcripcional, la metilación del promotor de un gen suele conllevar una reducción en la expresión génica (Szyf, 2011). De acuerdo con esto, una hipótesis que permitiría explicar nuestros hallazgos sería que los pacientes con niveles bajos de metilación en el promotor del gen *HTR1B* tendrían una mayor actividad transcripcional de dicho gen, por lo que los niveles del receptor serían más elevados. En consecuencia, se liberaría menos serotonina y se produciría una disminución en los niveles del neurotransmisor. Estos pacientes, por lo tanto, serían más susceptibles de experimentar una mayor mejoría clínica al ser tratados con ISRSs como la fluoxetina. Los estudios realizados hasta la fecha con el objetivo de identificar cambios de metilación asociados con la respuesta a los antidepresivos son limitados y todos ellos se han llevado a cabo en los últimos años. En cuanto a los niveles de metilación del gen *HTR1B*, es importante remarcar que esta es la primera vez que se analiza su efecto en la respuesta al tratamiento antidepresivo. Hasta la fecha, el gen más estudiado ha sido el *SLC6A4*, que codifica para el transportador de serotonina. Se ha descrito que los niveles de metilación bajos en este gen podrían estar asociados con una peor respuesta a los antidepresivos (Domschke et al., 2014; Okada et al., 2014). El mecanismo propuesto para explicar estos hallazgos sugiere que un aumento en la expresión del transportador de serotonina derivado de la hipometilación del promotor provocaría una reducción de la biodisponibilidad de serotonina, contrarrestando así los efectos de los antidepresivos.

Sin embargo, el papel del receptor de serotonina 1B en la respuesta al tratamiento antidepresivo parece ser más complejo (Carr and Lucki, 2011). Mientras que los antagonistas del autoreceptor de serotonina 1B han demostrado ser efectivos en modelos preclínicos de TOC y otros trastornos psiquiátricos como la depresión o la ansiedad (Dawson et al., 2006; Ho et al., 2016; Tatarczyńska et al., 2004), la activación de los heteroreceptores induce efectos antidepresivos (Chenu et al., 2008). Esta complejidad es debida, en parte, a la heterogénea distribución de estos receptores en el cerebro así como al hecho de que en distintas áreas cerebrales el patrón de metilación puede ser diferente. Por lo tanto, resulta más difícil predecir la influencia de los cambios de expresión en el gen

HTR1B en la neurotransmisión de la serotonina, debido a que puede tener efectos activadores o inhibidores dependiendo del tipo de neurona donde se exprese (Drago et al., 2010). Dado que el mecanismo de acción de los ISRSs parece implicar una reducción en los niveles de expresión de *HTR1B* (Anthony et al., 2000; Neumaier et al., 1996), es plausible que las variantes genéticas y epigenéticas de *HTR1B* puedan afectar a la mejoría clínica. No obstante, son necesarios más estudios que permitan comprender mejor la compleja regulación de la actividad transcripcional de dicho gen tanto en la sinapsis serotoninérgica como en otras sinapsis, para determinar su impacto real en la respuesta al tratamiento con fluoxetina.

Además de las asociaciones descritas para el gen *HTR1B*, los resultados del primer análisis de asociación farmacogenética llevado a cabo en esta tesis indicaron que la respuesta terapéutica a la fluoxetina se encuentra relacionada con otro polimorfismo del sistema serotoninérgico (rs4570625) localizado en el gen *TPH2*. Este gen codifica para la triptófano hidroxilasa, que cataliza el paso limitante de la biosíntesis de serotonina. Existen dos isoformas de esta enzima: TPH1 y TPH2, siendo la última la que parece expresarse de forma más selectiva en el cerebro (Zill et al., 2007). Algunas variantes en este gen han sido asociadas previamente con el TOC o la sintomatología obsesivo-compulsiva y perfeccionista en condiciones no patológicas (Di Nocera et al., 2014; Mas et al., 2013). En consecuencia, el gen *TPH2* resulta un gen candidato importante en los estudios de farmacogenética de la respuesta al tratamiento con fluoxetina (Porcelli et al., 2011). Se ha observado que el tratamiento de larga duración con fluoxetina aumenta los niveles de expresión de *TPH2*, cosa que parece producirse de forma simultánea al efecto antidepresivo (Shishkina et al., 2007). En nuestro estudio, hemos identificado que el polimorfismo rs4570625 del *TPH2* se encuentra asociado con la mejoría clínica tras el tratamiento con fluoxetina. Concretamente, los homocigotos para el alelo minoritario (TT) mostraron una mayor reducción en la puntuación de las escalas de evaluación clínica. Este polimorfismo se localiza en la región promotora del gen *TPH2* y parece tener una importante función biológica. A pesar de que son necesarios más estudios que permitan esclarecer el impacto real de esta variante en la expresión cerebral del gen y en la síntesis de serotonina, se ha demostrado que un haplotipo que contiene el alelo T podría reducir la expresión genética en cultivos celulares (Chen et al., 2008). Además, se ha observado que los portadores del alelo T presentan volúmenes reducidos de la amígdala bilateral y el hipocampo (Inoue et al., 2010). Este polimorfismo se ha asociado también con distintos trastornos psiquiátricos, entre ellos el TOC (Mössner et al., 2006) pero también los trastornos de pánico (Kim et al., 2009), el trastorno de ansiedad (Chi et al., 2013) o el TDM (Gao et al., 2012). Curiosamente, los resultados de un metaanálisis en el que se incluyeron más de 70 SNPs del *TPH2* mostraron que el alelo T del

rs4570625 se encontraba asociado con el TDM (Gao et al., 2012). Por lo que respecta al tratamiento antidepresivo, esta variante genética ha sido recientemente asociada con la respuesta a citalopram en niños y adolescentes (Peters et al., 2004; Rotberg et al., 2013) y con la respuesta a escitalopram (Su et al., 2016). No obstante, este polimorfismo podría no ser funcional dado que no parece estar localizado en un lugar de unión a factores de transcripción, por lo que podrían existir otras variantes que se encuentren en desequilibrio de ligamiento con este SNP que sean las verdaderas causantes de estas asociaciones. De hecho, otros polimorfismos del gen *TPH2* que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con el SNP rs4570625 se han relacionado con la respuesta a la fluoxetina (Peters et al., 2004; Tsai et al., 2009b).

En conclusión, los resultados de nuestros estudios aportan nuevas evidencias sobre la influencia de la genética en la respuesta terapéutica tras el tratamiento con fluoxetina en niños y adolescentes. Concretamente, hemos descrito que las variantes genéticas y epigenéticas en genes relacionados con el sistema serotoninérgico, específicamente *HTR1B* y *TPH2*, podrían tener un papel importante en la variabilidad observada en la respuesta clínica al tratamiento con fluoxetina. Estos marcadores genéticos podrían ser útiles para predecir la respuesta farmacológica con el fin de seleccionar un tratamiento individualizado que permita alcanzar un mayor beneficio terapéutico y un mejor pronóstico en el menor tiempo posible, mejorando así la estrategia terapéutica actual. No obstante, otros genes no estudiados en esta tesis podrían estar influyendo también en la respuesta terapéutica. Por ello, es necesario llevar a cabo más estudios que permitan replicar las asociaciones identificadas en nuestra población así como identificar nuevas variantes génicas que posibiliten el desarrollo de predictores farmacogenéticos de la respuesta a fluoxetina.

5.3 Limitaciones y puntos fuertes

Para poder interpretar correctamente los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral resulta conveniente tener en consideración las limitaciones existentes en cada uno de los estudios que la componen.

En el *estudio 1* la principal limitación que encontramos es que el tamaño de la muestra utilizada es relativamente reducido, limitando así su poder estadístico. En consecuencia, y dado que la frecuencia de los distintos alelos identificados en nuestra población es considerablemente pequeña, resulta difícil detectar asociaciones significativas para las variantes genéticas con efectos pequeños y moderados. Además, es importante remarcar que el estudio de asociación se llevó a cabo utilizando

dos poblaciones de referencia distintas obtenidas a partir de la información depositada en bases de datos y, por lo tanto, no constituyen una población control específica para nuestro grupo de pacientes con TOC. Así, a pesar de ser poblaciones con un elevado tamaño muestral, incluyen controles poblacionales en los que no se evaluó la posible presencia de enfermedades neuropsiquiátricas.

En cuanto al *estudio 2*, debe tenerse en cuenta que algunos de los pacientes incluidos presentaban también otros trastornos psiquiátricos comórbidos y recibían tratamiento farmacológico. Sin embargo, no se observó que ninguno de estos dos factores contribuyera significativamente a los efectos diferenciales observados entre casos y controles con respecto a los parámetros inmunológicos evaluados. Además, es importante tener en cuenta que las determinaciones se han llevado a cabo en cultivos primarios de monocitos, por lo que los efectos de estas variables clínicas pueden quedar parcialmente diluidos, reforzando así la asociación establecida entre los parámetros inmunológicos y el TOC. Por otro lado, entre las limitaciones de este estudio cabe mencionar el tamaño de la muestra para la población control. A pesar de que es aconsejable que la muestra de controles tenga un tamaño como mínimo similar al de la población de estudio, debido a las frecuentes dificultades en el reclutamiento de niños y adolescentes sanos no nos fue posible incluir un número mayor de controles. A su vez, existía un desequilibrio por lo que respecta a la edad y al sexo entre la población de pacientes con TOC y los individuos control incluidos en el estudio. No obstante, no se observó ninguna asociación significativa entre estos dos factores y los parámetros inmunológicos evaluados.

En el estudio de *microarrays* llevado a cabo en una muestra seleccionada de los individuos incluidos en el *estudio 2* debe tenerse en cuenta que el tamaño de la muestra utilizada podría representar una limitación a la hora de identificar asociaciones significativas tras las correcciones por múltiples comparaciones aplicadas. Además, debido al reducido tamaño de la muestra no fue posible realizar un análisis estratificado de la población en base a determinadas características clínicas como la presencia de comorbilidades o de tratamiento farmacológico. Por otro lado, dado que las muestras incluidas en este estudio fueron escogidas de acuerdo con los resultados obtenidos en el *estudio 2* (priorizando los pacientes y los controles que presentaban un mayor y un menor estado proinflamatorio, respectivamente), podría ser que el análisis conjunto de todos los individuos reclutados no proporcionara los mismos resultados. En este caso, los hallazgos identificados en esta primera aproximación podrían indicar la existencia de un subgrupo entre los pacientes con TOC asociado con la presencia de alteraciones inmunitarias.

Globalmente, debe tenerse en consideración que tanto en el *estudio 2* como en el estudio de *microarrays* se han llevado a cabo determinaciones de parámetros inmunológicos únicamente a nivel periférico y, por lo tanto, resulta necesario realizar más investigaciones con el fin de evaluar las posibles alteraciones en el sistema inmunitario existentes a nivel central, especialmente por lo que respecta a la microglía. No obstante, a pesar de que se trata de marcadores periféricos, tanto los monocitos como las citoquinas liberadas por estas células son capaces de penetrar en el SNC por lo que la desregulación periférica podría contribuir también al desarrollo del trastorno. Además, dado que los monocitos y la microglía derivan de la misma línea mieloide, el estado proinflamatorio observado en los monocitos circulantes podrían ser un reflejo de una activación de la microglía a nivel cerebral.

De acuerdo con lo que se ha comentado para el *estudio 1*, la principal limitación de los estudios de farmacogenética llevados a cabo en la presente tesis (*estudios 3 y 4*) es el reducido tamaño de la muestra utilizada por lo que el poder estadístico resulta insuficiente para descartar la contribución de las variantes genéticas que puedan tener efectos pequeños sobre la respuesta terapéutica. Además, el reducido tamaño muestral aumenta el riesgo de aparición de falsos positivos, especialmente si tenemos en cuenta el elevado número de polimorfismos analizados. No obstante, para controlar el error de tipo I se aplicó la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Esta corrección es altamente conservadora dado que asume que todas las comparaciones realizadas son independientes mientras que en realidad existe desequilibrio de ligamiento entre muchas de las variantes estudiadas así como una elevada correlación entre las distintas escalas clínicas evaluadas.

Cabe destacar también que no todos los pacientes incluidos en los estudios de farmacogenética tenían un diagnóstico de TOC sino que se incluyeron también individuos con un diagnóstico principal de TDM o TAG. No obstante, un gran número de pacientes presentaba síntomas obsesivo-compulsivos patológicos. A pesar de ello, la variabilidad diagnóstica fue controlada gracias a la inclusión de esta variable en el análisis estadístico. A su vez, el hecho de que algunos pacientes recibieran medicación en algún punto del estudio podría afectar a la respuesta terapéutica, a pesar de que no se detectaron diferencias en la mejoría clínica entre los pacientes que recibían medicación y los que no. Por último, debe tenerse en cuenta que los niveles de metilación se evaluaron en una muestra de sangre periférica y que, por tanto, podrían ser distintos a los que se encuentran a nivel cerebral.

A pesar de las limitaciones comentadas para cada uno de los estudios, deben destacarse algunos puntos fuertes de las investigaciones llevadas a cabo en la presente tesis doctoral. En primer lugar

cabe remarcar la originalidad de los estudios incluidos dado que es la primera vez que se lleva a cabo una exploración de los alelos HLA y una caracterización de los monocitos circulantes y de su funcionalidad en pacientes con TOC. Además, el estudio de los monocitos se realizó desde distintas perspectivas, evaluando no solo los marcadores de superficie sino también su funcionalidad y sus perfiles de expresión tanto en condiciones basales como en respuesta a estímulos inmunitarios utilizando cultivos primarios. Por otro lado, el análisis de expresión génica se basó en la identificación de los procesos biológicos afectados y no únicamente en el estudio de genes concretos. En conjunto, los resultados obtenidos en los distintos experimentos realizados son altamente consistentes, lo cual refuerza aún más la hipótesis planteada en esta tesis.

Por lo que respecta a los estudios de farmacogenética, son pocos los estudios que se han llevado a cabo hasta la fecha en población infantil por lo que los resultados obtenidos en la presente tesis aportan información novedosa y relevante en este campo. Además, en estos estudios se ha integrado tanto información genética como epigenética, siendo la primera vez que se evalúa la relación existente entre los niveles de metilación del gen *HTR1B* y la respuesta terapéutica a fluoxetina.

Por otro lado, resulta importante remarcar la homogeneidad de las muestras incluidas en los distintos estudios que componen la presente tesis por lo que respecta a la edad, edad de inicio y tiempo de evolución de la enfermedad, dado que todos ellos se llevaron a cabo en una población de niños y adolescentes. En el caso de los estudios sobre la contribución de las alteraciones inmunitarias a la etiopatogenia del TOC, la inclusión de población infanto-juvenil resulta especialmente útil ya que permite explorar los mecanismos específicos implicados en el TOC de inicio temprano que, tal y como se ha comentado anteriormente, podría presentar una etiopatogenia distinta del trastorno de inicio en la edad adulta. Cabe destacar, además, que en los estudios farmacogenéticos todos los individuos incluidos comenzaron el tratamiento con fluoxetina al inicio del estudio, siendo la primera vez que se les prescribía un tratamiento antidepresivo, contribuyendo así a la homogeneidad de la muestra en estos estudios. Esta homogeneidad constituye una ventaja respecto a otros estudios llevados a cabo en poblaciones más heterogéneas en los que resulta necesario estratificar la muestra.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

6.1 Conclusiones

1. Variantes alélicas del gen *HLA-DRB1* se encuentran asociadas con el TOC de inicio temprano. Concretamente, la presencia de alelos de riesgo pertenecientes al serotipo DR4 confiere un mayor riesgo de padecer TOC.
2. Existe una predisposición proinflamatoria en los monocitos de pacientes con TOC de inicio en la infancia y la adolescencia determinada por sus características fenotípicas y por su funcionalidad en respuesta a estímulos inmunitarios.
3. Los pacientes con TOC de inicio temprano presentan un porcentaje superior de monocitos totales así como de monocitos proinflamatorios, tanto intermedios como no clásicos.
4. La respuesta inflamatoria a estímulos inmunitarios como el LPS es más acentuada en los cultivos primarios de monocitos de pacientes con TOC que en los de individuos control. En estas condiciones, los monocitos de los individuos con TOC producen cantidades superiores de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , la IL-6, el GM-CSF, el TNF- α y la IL-8.
5. Existen diferencias en el perfil de expresión génica entre los monocitos cultivados de pacientes con TOC y los de los sujetos control. Muchos de los genes que presentaron una expresión diferenciada, tanto en condiciones basales como en respuesta a estímulos proinflamatorios, participan en procesos inmunitarios.
6. Las variantes genéticas y epigenéticas en genes relacionados con el sistema de la serotonina, y más concretamente en los genes *HTR1B* y *TPH2*, condicionan la mejoría clínica tras el tratamiento con fluoxetina en niños y adolescentes.
7. Los polimorfismos rs130058, rs9361233 y rs9361235, localizados en lugares de unión a factores de transcripción del gen *HTR1B*, están asociados con la respuesta al tratamiento con fluoxetina.
8. Los niveles de metilación del promotor del gen *HTR1B* se correlacionan con el grado de respuesta terapéutica a la fluoxetina. Concretamente, los individuos con unos niveles de metilación más bajos parecen presentar una mayor mejoría clínica tras el tratamiento farmacológico.
9. Los individuos homocigotos para el alelo minoritario (TT) del polimorfismo rs4570625 del gen *TPH2* experimentan una mayor mejoría clínica tras el tratamiento con fluoxetina.

6.2 Conclusions

1. Allelic variants of the *HLA-DRB1* gene are associated with early-onset OCD. Specifically, the risk alleles of the DR4 serotype confer a greater risk of suffering from OCD.
2. There is a proinflammatory predisposition in monocytes from children and adolescents with OCD determined by their particular phenotype and functionality in response to immune stimuli.
3. Early-onset OCD patients have higher percentages of total and proinflammatory monocytes, with higher ratios of both the intermediate and non-classical subsets.
4. The inflammatory response to immune stimuli such as LPS is more pronounced in the primary cultures of monocytes from OCD patients than in those from controls. Under these conditions, monocytes from OCD individuals produce higher amounts of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, GM-CSF, TNF- α and IL-8.
5. There are differences in gene expression profiles between cultured monocytes from OCD patients and those from control subjects. Many of the genes that showed differential expression, both in basal conditions and after proinflammatory stimuli, are involved in immune processes.
6. Genetic and epigenetic variants in genes related to the serotonin system, and specifically in the *HTR1B* and *TPH2* genes, are involved in clinical improvement after fluoxetine treatment in child and adolescent patients.
7. The polymorphisms rs130058, rs9361233 and rs9361235, which are located in transcription factor binding sites of the *HTR1B* gene, are associated with fluoxetine response.
8. Methylation levels of *HTR1B* promoter are correlated with the therapeutic response to fluoxetine. Specifically, individuals with lower methylation levels seem to show higher clinical improvement after pharmacological treatment.
9. Homozygous patients for the minor allele (TT) of the *TPH2* rs4570625 polymorphism experience higher clinical improvement after fluoxetine treatment.

IMPLICACIONES CLÍNICAS Y LÍNEAS FUTURAS

7 IMPLICACIONES CLÍNICAS Y LÍNEAS FUTURAS

Los resultados obtenidos en los estudios que conforman la presente tesis doctoral aportan información novedosa y relevante en el campo de la etiopatogenia del TOC y la farmacogenética de la fluoxetina. Las evidencias generadas sobre una posible desregulación del sistema inmunitario y de la respuesta inflamatoria en los pacientes con este trastorno abren la vía a una nueva estrategia terapéutica basada en el uso de fármacos antiinflamatorios en combinación con los antidepresivos, que podría ser útil en algunos pacientes que no responden a la terapia convencional. Por otro lado, el uso de marcadores clínicos y genéticos, como los identificados en los estudios de farmacogenética de esta tesis, podrá ayudar a predecir la respuesta clínica y realizar así terapias más personalizadas que serán más eficaces y seguras, lo que mejorará en gran medida la calidad de vida y el pronóstico del paciente. Todo ello conduciría, además, a una reducción importante de los costes sanitarios. No obstante, a pesar de la relevancia de nuestros resultados es necesario llevar a cabo más estudios que permitan confirmar los hallazgos obtenidos y ampliar el conocimiento aportado.

Para ello, nos planteamos continuar profundizando en los mecanismos inmunitarios implicados en la etiopatogenia del TOC. Así, pretendemos replicar los resultados obtenidos en el estudio de microarrays, realizado en 8 pacientes y 8 controles, en el resto de nuestra muestra, mediante la selección de algunos de los genes diferencialmente expresados relacionados con el sistema inmunitario, preferentemente aquellos que puedan ser expresados también en células de la microglía. Por otro lado, se llevará a cabo una exploración de las posibles alteraciones en otras células del sistema inmunitario como los linfocitos T reguladores. Además, se pretende integrar los datos sobre las alteraciones inmunológicas identificadas en los pacientes con TOC junto con las características clínicas de estos individuos con la intención de proporcionar una interpretación funcional más precisa de nuestros hallazgos y de su implicación en la fisiopatología del trastorno. En base a los resultados obtenidos, se plantea llevar a cabo una selección de genes candidatos para explorar la influencia de la variabilidad genética en el riesgo de padecer TOC y de presentar determinadas características clínicas de la enfermedad. Esto ayudará a identificar biomarcadores de diagnóstico y de pronóstico del trastorno. A su vez, las evidencias generadas podrán proporcionar nueva información acerca de posibles dianas terapéuticas útiles para el desarrollo de nuevos fármacos.

En cuanto al estudio de predictores de la respuesta al tratamiento con fluoxetina, los marcadores genéticos identificados son insuficientes para explicar toda la variabilidad interindividual existente

en la respuesta clínica. Hasta el momento hemos explorado genes candidatos seleccionados en base al conocimiento existente sobre la farmacocinética y el mecanismo de acción de la fluoxetina. Sin embargo, otros genes podrían jugar un papel importante en la respuesta farmacológica. Con el objetivo de conocer mejor los procesos biológicos implicados en la respuesta al tratamiento y de identificar nuevos genes candidatos, planteamos una estrategia convergente basada en la integración de datos sobre los cambios en la expresión génica y en los patrones de metilación del ADN en sangre periférica inducidos por el tratamiento con fluoxetina. El conocimiento derivado de este estudio nos permitirá llevar a cabo una exploración de la variabilidad genética en los nuevos genes candidatos seleccionados con la intención de desarrollar un predictor más preciso de la respuesta al tratamiento. Además, dado que un gran número de pacientes con TOC realiza también terapia psicológica con una gran variabilidad en la tasa de respuesta, nos planteamos utilizar la misma estrategia, evaluando los cambios en la expresión génica y en la metilación del ADN en pacientes que se hayan sometido a terapia psicológica, con la intención de identificar marcadores genéticos de la respuesta a la psicoterapia. Globalmente, los resultados de estas exploraciones podrían ayudar a identificar nuevos genes candidatos útiles para el desarrollo de predictores de respuesta al tratamiento psico-farmacológico con el fin último de realizar una terapia personalizada que sea más eficaz y segura en cada paciente según sus características clínicas y genéticas.

Finalmente, las líneas futuras de investigación en este campo deberían ir encaminadas hacia la realización de estudios longitudinales con muestras de pacientes homogéneas y de mayor tamaño, que permitan controlar las posibles fuentes de discrepancia existentes actualmente en la literatura, entre las que se encuentran la edad de los pacientes, la edad de inicio del trastorno, los subtipos diagnósticos, la presencia de comorbilidades o las características asociadas al tratamiento recibido. Por otro lado, los estudios futuros deberían centrarse en la integración de datos de origen genómico, epigenómico, transcriptómico, proteómico y clínico, con el fin proporcionar una explicación más precisa del trastorno teniendo en consideración las posibles interacciones existentes entre los distintos factores asociados con la enfermedad y la respuesta terapéutica de estos pacientes.

En conclusión, debemos incidir en la importancia de continuar con la línea de investigación de la presente tesis doctoral para mejorar el conocimiento acerca de la implicación de los mecanismos neuroinmunitarios en la etiopatogenia del TOC así como para identificar nuevos y mejores marcadores genéticos y clínicos capaces de predecir la respuesta terapéutica en pacientes afectados por este trastorno. De este modo, se podrá avanzar en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y en la mejora de los tratamientos actuales, optimizando así la estrategia de intervención actual.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abramovitch, A., Dar, R., Mittelman, A., Wilhelm, S., 2015. Comorbidity Between Attention Deficit/Hyperactivity Disorder and Obsessive-Compulsive Disorder Across the Lifespan. *Harv Rev Psychiatry* 23, 245–262.
- Abramowitz, J.S., Taylor, S., McKay, D., 2009. Obsessive-compulsive disorder. *Lancet* 374, 491–499.
- Alboni, S., Poggini, S., Garofalo, S., Milior, G., El Hajj, H., Lecours, C., et al., 2016. Fluoxetine treatment affects the inflammatory response and microglial function according to the quality of the living environment. *Brain Behav Immun* 58, 261-271.
- Allen, A.J., Leonard, H.L., Swedo, S.E., 1995. Case study: a new infection-triggered, autoimmune subtype of pediatric OCD and Tourette's syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 34, 307–311.
- Alonso, R., Salavert, F., Garcia-Garcia, F., Carbonell-Caballero, J., Bleda, M., Garcia-Alonso, L., et al., 2015. Babelomics 5.0: Functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Res* 43, W117–W121.
- Anthony, J.P., Sexton, T.J., Neumaier, J.F., 2000. Antidepressant-induced regulation of 5-HT(1_B) mRNA in rat dorsal raphe nucleus reverses rapidly after drug discontinuation. *J Neurosci Res* 61, 82–87.
- American Psychiatric Association, 2013. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press.
- American Psychiatric Association, 1994. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press.
- Arias, B., Serretti, A., Lorenzi, C., Gastó, C., Catalán, R., Fañanás, L., 2006. Analysis of COMT gene (Val 158 Met polymorphism) in the clinical response to SSRIs in depressive patients of European origin. *J Affect Disord* 90, 251–256.
- Arnold, P.D., Askland, K.D., Barlassina, C., Bellodi, L., Bienvenu, O.J., Black, D., et al., 2017. Revealing the complex genetic architecture of obsessive–compulsive disorder using meta-analysis. *Mol Psychiatry* 1–8.
- Ashburner, M., Ball, C., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., et al., 2000. Gene ontology: Tool for the identification of biology. *Nat Genet* 25, 25–29.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F., 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669–692.
- Baganz, N.L., Blakely, R.D., 2013. A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem Neurosci* 4, 48–63.
- Benedetti, F., Colombo, C., Pirovano, A., Marino, E., Smeraldi, E., 2009. The catechol-O-methyltransferase Val(108/158)Met polymorphism affects antidepressant response to paroxetine in a naturalistic setting. *Psychopharmacology (Berl)* 203, 155–160.
- Benedetti, F., Dallaspèzia, S., Colombo, C., Lorenzi, C., Pirovano, A., Smeraldi, E., 2010. Effect of catechol-O-methyltransferase Val(108/158)Met polymorphism on antidepressant efficacy of fluvoxamine. *Eur Psychiatry* 25, 476–478.
- Benros, M.E., Mortensen, P.B., Eaton, W.W., 2012. Autoimmune diseases and infections as risk factors for schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1262, 56–66.
- Bergink, V., Gibney, S.M., Drexhage, H.A., 2014. Autoimmunity, inflammation, and psychosis: A search for peripheral markers. *Biol Psychiatry* 75, 324–331.
- Beumer, W., Gibney, S.M., Drexhage, R.C., Pont-Lezica, L., Doorduyn, J., Klein, H.C., et al., 2012. The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *Journal Leukoc Biol* 92, 959–975.

- Bhattacharyya, S., Khanna, S., Chakrabarty, K., Mahadevan, A., Christopher, R., Shankar, S.K., 2009. Anti-brain autoantibodies and altered excitatory neurotransmitters in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacology* 34, 2489–2496.
- Biernacka, J.M., Sangkuhl, K., Jenkins, G., Whaley, R.M., Barman, P., Batzler, A., et al., 2016. Corrigendum: The International SSRI Pharmacogenomics Consortium (ISPC): A genome-wide association study of antidepressant treatment response. *Transl Psychiatry* 6, e937
- Biernacka, J.M., Sangkuhl, K., Jenkins, G., Whaley, R.M., Barman, P., Batzler, A., et al., 2015. The International SSRI Pharmacogenomics Consortium (ISPC): A genome-wide association study of antidepressant treatment response. *Transl Psychiatry* 5, e553.
- Binder, E.B., Salyakina, D., Lichtner, P., Wochnik, G.M., Ising, M., Pütz, B., et al., 2004. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet* 36, 1319–1325.
- Birmaher, B., Khetarpal, S., Brent, D., Cully, M., Balach, L., Kaufman, J., et al., 1997. The Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED): Scale Construction and Psychometric Characteristics. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36, 545–553.
- Blázquez, A., Mas, S., Plana, M.T., Gassó, P., Méndez, I., Torra, M., et al., 2014. Plasma Fluoxetine Concentrations and Clinical Improvement in an Adolescent Sample Diagnosed With Major Depressive Disorder, Obsessive-Compulsive Disorder, or Generalized Anxiety Disorder. *J Clin Psychopharmacol* 34, 318–326.
- Bloch, M.H., Landeros-Weisenberger, A., Rosario, M.C., Pittenger, C., Leckman, J.F., 2008. Meta-Analysis of the Symptom Structure of Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Psychiatry* 165, 1532–1542.
- Brambilla, F., Perna, G., Bellodi, L., Arancio, C., Bertani, A., Perini, G., et al., 1997. Plasma Interleukin-1 β and tumor necrosis factor concentrations in obsessive-compulsive disorders. *Biol Psychiatry* 42, 976–981.
- Brander, G., Pérez-Vigil, A., Larsson, H., Mataix-Cols, D., 2016. Systematic review of environmental risk factors for Obsessive-Compulsive Disorder: A proposed roadmap from association to causation. *Neurosci Biobehav Rev* 65, 36–62.
- Brown, T.A., Campbell, L.A., Lehman, C.L., Grisham, J.R., Mancill, R.B., 2001. Current and lifetime comorbidity of the DSM-IV anxiety and mood disorders in a large clinical sample. *J Abnorm Psychol* 110, 585–599.
- Browne, H.A., Gair, S.L., Scharf, J.M., Grice, D.E., 2014. Genetics of obsessive-compulsive disorder and related disorders. *Psychiatr Clin North Am* 37, 319–35.
- Bryńska, A., Wolańczyk, T., 2005. Epidemiology and phenomenology of obsessive-compulsive disorder in non-referred young adolescents: A Polish perspective. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 14, 319–327.
- Caiaffo, V., Oliveira, B.D.R., de Sá, F.B., Evêncio Neto, J., 2016. Anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activity of fluoxetine. *Pharmacol Res Perspect* 4, e00231.
- Canals, J., Hernández-Martínez, C., Cosi, S., Voltas, N., 2012. The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in Spanish school children. *J Anxiety Disord* 26, 746–752.
- Cappi, C., Brentani, H., Lima, L., Sanders, S.J., Zai, G., Diniz, B.J., et al., 2016. Whole-exome sequencing in obsessive-compulsive disorder identifies rare mutations and immunological pathways. *Transl Psychiatry* 6, e764.
- Cappi, C., Muniz, R.K., Sampaio, A.S., Cordeiro, Q., Brentani, H., Palácios, S.A., et al., 2012. Association study between functional polymorphisms in the TNF-alpha gene and obsessive-compulsive disorder. *Arq Neuropsiquiatr* 70, 87–90.
- Carlsson, M.L., 2000. On the role of cortical glutamate in obsessive-compulsive disorder and attention-deficit hyperactivity disorder, two phenomenologically antithetical conditions. *Acta Psychiatr Scand* 102, 401–413.

- Carpenter, L.L., Heninger, G.R., Mcdougle, C.J., Tyrka, A.R., Epperson, C.N., Price, L.H., 2002. Cerebrospinal fluid interleukin-6 in obsessive – compulsive disorder and trichotillomania. *Psychiatry Res* 112, 257–262.
- Carr, G. V., Lucki, I., 2011. The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: A review of animal studies. *Psychopharmacology (Berl)* 213, 265–287.
- Cavanna, A.E., Servo, S., Monaco, F., Robertson, M.M., 2009. The Behavioral Spectrum of Gilles de la Tourette Syndrome. *J. Neuropsychiatry Clin Neurosci* 21, 13–23.
- Chang, H.H., Chou, C.H., Yang, Y.K., Lee, I.H., Chen, P.S., 2015. Association between ABCB1 polymorphisms and antidepressant treatment response in taiwanese major depressive patients. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 13, 250–255.
- Charlier, C., Broly, F., Lhermitte, M., Pinto, E., Anseau, M., Plomteux, G., 2003. Polymorphisms in the CYP 2D6 Gene: association with plasma concentrations of fluoxetine and paroxetine. *Ther Drug Monit* 25, 738–742.
- Chen, G.L., Vallender, E.J., Miller, G.M., 2008. Functional characterization of the human TPH2 5' regulatory region: untranslated region and polymorphisms modulate gene expression in vitro. *Hum Genet* 122, 645–657.
- Chen, S.K., Tvrdik, P., Peden, E., Cho, S., Wu, S., Spangrude, G., et al., 2010. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell* 141, 775–785.
- Chenu, F., David, D.J.P., Leroux-Nicollet, I., Le Maître, E., Gardier, A.M., Bourin, M., 2008. Serotonin1B heteroreceptor activation induces an antidepressant-like effect in mice with an alteration of the serotonergic system. *J Psychiatry Neurosci* 33, 541–550.
- Chi, M.H., Chang, H.H., Lee, S.Y., Lee, I.H., Gean, P.W., Yang, Y.K., et al., 2010. Brain derived neurotrophic factor gene polymorphism (Val66Met) and short-term antidepressant response in major depressive disorder. *J Affect Disord* 126, 430–435.
- Chi, S., Teng, L., Song, J.H., Zhou, C., Pan, W.H., Zhao, R.L., et al., 2013. Tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms and poststroke anxiety disorders. *J Affect Disord* 144, 179–182.
- Chien, Y.L., Wu, Y.Y., Chen, C.H., Gau, S.S.F., Huang, Y.S., Chien, W.H., et al., 2012. Association of HLA-DRB1 alleles and neuropsychological function in autism. *Psychiatr Genet* 22, 46–49.
- Choi, M.J., Kang, R.H., Lim, S.W., Oh, K.S., Lee, M.S., 2006. Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphism (Val66Met) and citalopram response in major depressive disorder. *Brain Res* 1118, 176–182.
- Chorley, B.N., Wang, X., Campbell, M.R., Pittman, G.S., Noureddine, M.A., Bell, D.A., 2008. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies. *Mutat Res* 659, 147–157.
- Corregiari, F.M., Bernik, M., Cordeiro, Q., Vallada, H., 2012. Endophenotypes and serotonergic polymorphisms associated with treatment response in obsessive-compulsive disorder. *Clinics* 67, 335–340.
- Coskun, M., Zoroglu, S., 2009. Efficacy and Safety of Fluoxetine in Preschool Children with Obsessive-Compulsive Disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 19, 297–300.
- Costas, J., Carrera, N., Alonso, P., Gurriarán, X., Segalàs, C., Real, E., et al., 2016. Exon-focused genome-wide association study of obsessive-compulsive disorder and shared polygenic risk with schizophrenia. *Transl Psychiatry* 6, e768.
- Cros, J., Cagnard, N., Wolland, K., Patey, N., Zhang, S.Y., Senechal, B., et al., 2010. Human CD14 dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375–386.
- da Rocha, F.F., Correa, H., Teixeira, A.L., 2008. Obsessive-compulsive disorder and immunology: A review. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 32, 1139–1146.
- Dale, R.C., Heyman, I., Giovannoni, G., Church, A.J., 2005. Incidence of anti-brain antibodies in children with obsessive-compulsive disorder. *Br J Psychiatry* 187, 314–319.

- Davis, L.K., Yu, D., Keenan, C.L., Gamazon, E.R., Konkashbaev, A.I., Derks, E.M., et al., 2013. Partitioning the Heritability of Tourette Syndrome and Obsessive Compulsive Disorder Reveals Differences in Genetic Architecture. *PLoS Genet.* 9, e1003864
- Dawson, L.A., Hughes, Z.A., Starr, K.R., Storey, J.D., Bettelini, L., Bacchi, F., et al., 2006. Characterisation of the selective 5-HT_{1B} receptor antagonist SB-616234-A (1-[6-(cis-3,5-dimethylpiperazin-1-yl)-2,3-dihydro-5-methoxyindol-1-yl]-1-[2'-methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)biphenyl-4-yl]methanone hydrochloride): In vivo neurochemical and behavioural evidence of anxiolytic/antidepressant activity. *Neuropharmacology* 50, 975–983.
- de Mathis, M.A., Diniz, J.B., Hounie, A.G., Shavitt, R.G., Fossaluza, V., Ferrão, Y., et al., 2013. Trajectory in obsessive-compulsive disorder comorbidities. *Eur Neuropsychopharmacol* 23, 594–601.
- Dell'Osso, B., Benatti, B., Hollander, E., Fineberg, N., Stein, D.J., Lochner, C., et al., 2016. Childhood, adolescent and adult age at onset and related clinical correlates in obsessive-compulsive disorder: a report from the International College of Obsessive-Compulsive Spectrum Disorders (ICOCs). *Int J Psychiatry Clin Pract* 20, 210–217.
- den Braber, A., Zilhão, N.R., Fedko, I.O., Hottenga, J.J., Pool, R., Smit, D.J.A., et al., 2016. Obsessive-compulsive symptoms in a large population-based twin-family sample are predicted by clinically based polygenic scores and by genome-wide SNPs. *Transl Psychiatry* 6, e731.
- Denney, D.R., Frei, B.W., Gaffney, G.R., 1996. Lymphocyte subsets and interleukin-2 receptors in autistic children. *J Autism Dev Disord* 26, 87–97.
- Denys, D., Fluitman, S., Kavelaars, A., Heijnen, C., Westenberg, H., 2004. Decreased TNF- α and NK activity in obsessive-compulsive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 29, 945–952.
- Denys, D., Fluitman, S., Kavelaars, A., Heijnen, C., Westenberg, H.G.M., 2006. Effects of paroxetine and venlafaxine on immune parameters in patients with obsessive compulsive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 31, 355–360.
- Di Nocera, F., Colazingari, S., Trabalza, A., Mamazza, L., Bevilacqua, A., 2014. Association of TPH2 and dopamine receptor gene polymorphisms with obsessive-compulsive symptoms and perfectionism in healthy subjects. *Psychiatry Res* 220, 1172–1173.
- Doherty, G.H., 2007. Developmental switch in the effects of TNF α on ventral midbrain dopaminergic neurons. *Neurosci Res* 57, 296–305.
- Domschke, K., Dannlowski, U., Ohrmann, P., Lawford, B., Bauer, J., Kugel, H., et al., 2008a. Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: Impact on antidepressant treatment response and emotion processing in Major Depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 18, 751–759.
- Domschke, K., Hohoff, C., Mortensen, L.S., Roehrs, T., Deckert, J., Arolt, V., et al., 2008b. Monoamine oxidase A variant influences antidepressant treatment response in female patients with Major Depression. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 32, 224–228.
- Domschke, K., Tidow, N., Schwarte, K., Deckert, J., Lesch, K.-P., Arolt, V., et al., 2014. Serotonin transporter gene hypomethylation predicts impaired antidepressant treatment response. *Int J Neuropsychopharmacol* 17, 1167–1176.
- Drago, A., Alboni, S., Nicoletta, B., De Ronchi, D., Serretti, A., 2010. HTR1B as a risk profile maker in psychiatric disorders: A review through motivation and memory. *Eur J Clin Pharmacol* 66, 5–27.
- Drago, A., De Ronchi, D., Serretti, A., 2009. Pharmacogenetics of antidepressant response: An update. *Hum Genomics* 3, 257–274.
- Drexhage, R.C., van der Heul-Nieuwenhuijsen, L., Padmos, R.C., van Beveren, N., Cohen, D., Versnel, M.A., et al., 2010. Inflammatory gene expression in monocytes of patients with schizophrenia: overlap and difference with bipolar disorder. A study in naturalistically treated patients. *Int J Neuropsychopharmacol* 13, 1369–1381.

- Duan, J., Sanders, A.R., Molen, J.E.V., Martinolich, L., Mowry, B.J., Levinson, D.F., et al., 2003. Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression. *Mol Psychiatry* 8, 901–910.
- Dunn, A., 2006. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res* 6, 52–68.
- Edmonson, C.A., Ziats, M.N., Rennert, O.M., 2016. A non-inflammatory role for microglia in autism spectrum disorders. *Front Neurol* 7, 9.
- Ellsworth, K.A., Moon, I., Eckloff, B.W., Fridley, B.L., Jenkins, G.D., Batzler, A., et al., 2013. FKBP5 genetic variation: association with selective serotonin reuptake inhibitor treatment outcomes in major depressive disorder. *Pharmacogenet Genomics* 23, 156–166.
- Felger, J.C., Lotrich, F.E., 2013. Inflammatory Cytokines in Depression: Neurobiological Mechanisms and Therapeutic Implications. *Neuroscience* 246, 199–229.
- Fenske, J.N., Petersen, K., 2015. Obsessive-Compulsive Disorder: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician* 92, 896-903
- Fluitman, S.B.A.H.A., Denys, D.A.J.P., Heijnen, C.J., Westenberg, H.G.M., 2010a. Disgust affects TNF- α , IL-6 and noradrenalin levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 35, 906–911.
- Fluitman, S., Denys, D., Vulink, N., Schutters, S., Heijnen, C., Westenberg, H., 2010b. Lipopolysaccharide-induced cytokine production in obsessive-compulsive disorder and generalized social anxiety disorder. *Psychiatry Res* 178, 313–316.
- Foa, E.B., Coles, M., Huppert, J.D., Pasupuleti, R. V., Franklin, M.E., March, J., 2010. Development and Validation of a Child Version of the Obsessive Compulsive Inventory. *Behav Ther* 41, 121–132.
- Fontenelle, L.F., Barbosa, I.G., Luna, J.V., De Sousa, L.P., Abreu, M.N.S., Teixeira, A.L., 2012. A cytokine study of adult patients with obsessive-compulsive disorder. *Compr Psychiatry* 53, 797–804.
- Fontenelle, L.F., Hasler, G., 2008. The analytical epidemiology of obsessive-compulsive disorder: Risk factors and correlates. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 32, 1–15.
- Fontenelle, L.F., Mendlowicz, M. V., Versiani, M., 2006. The descriptive epidemiology of obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 30, 327–337.
- Franchini, L., Serretti, A., Gasperini, M., Smeraldi, E., 1998. Familial concordance of fluvoxamine response as a tool for differentiating mood disorder pedigrees. *J Psychiatr Res* 32, 255–259.
- Franklin, M.E., Kratz, H.E., Freeman, J.B., Ivarsson, T., Heyman, I., Sookman, D., et al., 2015. Cognitive-behavioral therapy for pediatric obsessive-compulsive disorder: Empirical review and clinical recommendations. *Psychiatry Res* 227, 78–92.
- Frick, L., Pittenger, C., 2016. Microglial dysregulation in OCD, Tourette syndrome, and PANDAS. *J Immunol Res* 2016, 8606057.
- Frick, L., Rapanelli, M., Abbasi, E., Ohtsu, H., Pittenger, C., 2016. Histamine regulation of microglia: Gene-environment interaction in the regulation of central nervous system inflammation. *Brain Behav Immun* 57, 326–337.
- Frick, L.R., Williams, K., Pittenger, C., 2013. Microglial dysregulation in psychiatric disease. *Clin Dev Immunol* 2013, 608654.
- Furtado, M., Katzman, M.A., 2015. Neuroinflammatory pathways in anxiety, posttraumatic stress, and obsessive compulsive disorders. *Psychiatry Res* 229, 37–48.
- Gabbay, V., Coffey, B.J., Guttman, L.E., Gottlieb, L., Katz, Y., Babb, J.S., et al., 2009. A cytokine study in children and adolescents with Tourette's disorder. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 33, 967–971.
- Gao, J., Pan, Z., Jiao, Z., Li, F., Zhao, G., Wei, Q., et al., 2012. TPH2 gene polymorphisms and major depression - a meta-analysis. *PLoS One* 7, e36721.

- Garriock, H.A., Kraft, J.B., Shyn, S.I., Peters, E.J., Yokoyama, J.S., Jenkins, G.D., et al., 2010. A Genome-Wide Association Study of Citalopram Response in Major Depressive Disorder. *Biol Psychiatry* 67, 133–138.
- Gassó, P., Ortiz, A.E., Mas, S., Morer, A., Calvo, A., Bargalló, N., et al., 2015. Association between genetic variants related to glutamatergic, dopaminergic and neurodevelopment pathways and white matter microstructure in child and adolescent patients with obsessive-compulsive disorder. *J Affect Disord* 186, 284–292.
- Gassó, P., Rodríguez, N., Mas, S., Pagerols, M., Blázquez, A., Plana, M.T., et al., 2014. Effect of CYP2D6, CYP2C9 and ABCB1 genotypes on fluoxetine plasma concentrations and clinical improvement in children and adolescent patients. *Pharmacogenomics J* 14, 457–462.
- Geller, D.A., Biederman, J., Griffin, S., Jones, J., Lefkowitz, T.R., 1996. Comorbidity of juvenile obsessive-compulsive disorder with disruptive behavior disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35, 1637–46.
- Geller, D., Biederman, J., Jones, J., Park, K., Schwartz, S., Shapiro, S., et al., 1998. Is Juvenile Obsessive-Compulsive Disorder a Developmental Subtype of the Disorder? A Review of the Pediatric Literature. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 37, 420–427.
- Geller, D.A., Biederman, J., Stewart, S.E., Mullin, B., Martin, A., Spencer, T., et al., 2003. Which SSRI? A meta-analysis of pharmacotherapy trials in pediatric obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 160, 1919–1928.
- Geller, D.A., Hoog, S.L., Heiligenstein, J.H., Ricardi, R.K., Tamura, R., Kluszynski, S., et al., 2001. Fluoxetine Treatment for Obsessive-Compulsive Disorder in Children and Adolescents: A Placebo-Controlled Clinical Trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40, 773–779.
- Geng, L.Y., Ye, D.Q., Shi, Y.Y., Xu, Z., Pu, M.J., Li, Z.Y., et al., 2014. Influence of Genetic Polymorphisms Involved in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and their Interactions with Environmental Factors on Antidepressant Response. *CNS Neurosci Ther* 20, 237–243.
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Francis, F., Riesgo, R., Savino, W., 2015. The impact of neuroimmune alterations in autism spectrum disorder. *Front Psychiatry* 6, 121.
- Gratacòs, M., Soria, V., Urretavizcaya, M., González, J.R., Crespo, J.M., Bayés, M., et al., 2008. A brain-derived neurotrophic factor (BDNF) haplotype is associated with antidepressant treatment outcome in mood disorders. *Pharmacogenomics J* 8, 101–112.
- Gray, S.M., Bloch, M.H., 2012. Systematic Review of Proinflammatory Cytokines in Obsessive-Compulsive Disorder. *Curr Psychiatry Rep* 14, 220–228.
- Greer, J.M., Capocchi, M.R., 2002. Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron* 33, 23–34.
- Guo, W., Samuels, J.F., Wang, Y., Cao, H., Ritter, M., Nestadt, P.S., et al., 2017. Polygenic risk score and heritability estimates reveals a genetic relationship between ASD and OCD. *Eur Neuropsychopharmacol* 27, 657–666.
- Guy, W., 1976. ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology, Revised. Bethesda, MD: United States Department of Health Education and Welfare.
- Ham, B.J., Lee, B.C., Paik, J.W., Kang, R.H., Choi, M.J., Choi, I.G., et al., 2007. Association between the tryptophan hydroxylase-1 gene A218C polymorphism and citalopram antidepressant response in a Korean population. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 31, 104–107.
- Heo, Y., Zhang, Y., Gao, D., Miller, V.M., Lawrence, D.A., 2011. Aberrant immune responses in a mouse with behavioral disorders. *PLoS One* 6, e20912.
- Hirschtritt, M.E., Bloch, M.H., Mathews, C.A., 2017. Obsessive-Compulsive Disorder. *Advances in diagnosis and treatment. Jama* 317, 1358-1367.
- Ho, E. V., Thompson, S.L., Katzka, W.R., Sharifi, M.F., Knowles, J.A., Dulawa, S.C., 2016. Clinically effective OCD treatment prevents 5-HT1B receptor-induced repetitive behavior and striatal activation. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 57–70.

- Hodgson, K., Tansey, K., Dernovšek, M.Z., Hauser, J., Henigsberg, N., Maier, W., et al., 2014. Genetic differences in cytochrome P450 enzymes and antidepressant treatment response. *J Psychopharmacol* 28, 133–141.
- Hofmeijer-Sevink, M.K., Van Oppen, P., Van Megen, H.J., Batelaan, N.M., Cath, D.C., Van Der Wee, N.J.A., et al., 2013. Clinical relevance of comorbidity in obsessive compulsive disorder: The Netherlands OCD Association study. *J Affect Disord* 150, 847–854.
- Hong, C.J., Chen, T.J., Yu, Y.W.Y., Tsai, S.J., 2006. Response to fluoxetine and serotonin 1A receptor (C-1019G) polymorphism in Taiwan Chinese major depressive disorder. *Pharmacogenomics J* 6, 27–33.
- Horstmann, S., Binder, E.B., 2009. Pharmacogenomics of antidepressant drugs. *Pharmacol Ther* 124, 57–73.
- Horstmann, S., Lucae, S., Menke, A., Hennings, J.M., Ising, M., Roeske, D., et al., 2010. Polymorphisms in GRIK4, HTR2A, and FKBP5 show interactive effects in predicting remission to antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* 35, 727–740.
- Hounie, A.G., Cappi, C., Cordeiro, Q., Sampaio, A.S., Moraes, I., do Rosário, M.C., et al., 2008. TNF-alpha polymorphisms are associated with obsessive-compulsive disorder. *Neurosci Lett* 442, 86–90.
- Houston, J.P., Kohler, J., Ostbye, K.M., Heinloth, A., Perlis, R.H., 2011. Association of catechol-O-methyltransferase variants with duloxetine response in major depressive disorder. *Psychiatry Res* 189, 475–477.
- Hu, Q., Zhang, S.Y., Liu, F., Zhang, X.J., Cui, G.C., Yu, E.Q., et al., 2015. Influence of GNB3 C825T polymorphism on the efficacy of antidepressants in the treatment of major depressive disorder: A meta-analysis. *J Affect Disord* 172, 103–109.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Tan, Q., Collins, J.R., Alvord, W.G., Roayaei, J., et al., 2007. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biol* 8, R183.
- Huang, Y.Y., Oquendo, M.A., Harkavy Friedman, J.M., Greenhill, L.L., Brodsky, B., Malone, K.M., 2003. Substance abuse disorder and major depression are associated with the human 5-HT1B receptor gene (HTR1B) G861C polymorphism. *Neuropsychopharmacology* 28, 163–169.
- Inoue, H., Yamasue, H., Tochigi, M., Takei, K., Suga, M., Abe, O., et al., 2010. Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on amygdalar and hippocampal volumes. *Brain Res* 1331, 51–57.
- Ising, M., 2009. A Genomewide Association Study Points to Multiple Loci That Predict Antidepressant Drug Treatment Outcome in Depression. *Arch Gen Psychiatry* 66, 966–975.
- Ivarsson, T., Melin, K., Wallin, L., 2008. Categorical and dimensional aspects of co-morbidity in obsessive-compulsive disorder (OCD). *Eur Child Adolesc Psychiatry* 17, 20–31.
- Ivarsson, T., Skarphedinsson, G., Kornør, H., Axelsdottir, B., Biedilæ, S., Heyman, I., et al., 2015. The place of and evidence for serotonin reuptake inhibitors (SRIs) for obsessive compulsive disorder (OCD) in children and adolescents: Views based on a systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res* 227, 93–103.
- Jenike, M.A., 2004. Obsessive – Compulsive Disorder. *N Engl J Med* 350, 259–265.
- Jia, P., Wang, L., Meltzer, H.Y., Zhao, Z., 2011. Pathway-based analysis of GWAS datasets: effective but caution required. *Int J Neuropsychopharmacol* 14, 567–72.
- Joyce, P.R., Mulder, R.T., Luty, S.E., McKenzie, J.M., Miller, A.L., Rogers, G.R., et al., 2003. Age-dependent antidepressant pharmacogenomics: polymorphisms of the serotonin transporter and G protein $\beta 3$ subunit as predictors of response to fluoxetine and nortriptyline. *Int J Neuropsychopharmacol* 6, 339–346.
- Kadasah, S., Arfin, M., Tariq, M., 2011. HLA-DRB1 association with schizophrenia in Saudi Arabian patients. *Int J Psychiatry Clin Pract* 15, 112–117.
- Kaluza, W., Reuss, E., Grossmann, S., Hug, R., Schopf, R.E., Galle, P.R., et al., 2000. Different transcriptional activity and in vitro TNF- α production in psoriasis patients carrying the TNF- α 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol* 114, 1180–1183.

- Kaufman, J., Birmaher, B., Brent, D., Rao, U., Flynn, C., Moreci, P., et al., 1997. Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version (K-SADS-PL): initial reliability and validity data. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36, 980–988.
- Keers, R., Bonvicini, C., Scassellati, C., Uher, R., Placentino, A., Giovannini, C., et al., 2011. Variation in GNB3 predicts response and adverse reactions to antidepressants. *J Psychopharmacol* 25, 867–874.
- Keeton, C., Kolos, A., Walkup, J., 2009. Pediatric generalized anxiety disorder: epidemiology, diagnosis, and management. *Paediatr Drugs* 11, 171–183.
- Keller, W.R., Kum, L.M., Wehring, H.J., Koola, M.M., Buchanan, R.W., Kelly, D.L., 2013. A review of anti-inflammatory agents for symptoms of schizophrenia. *J Psychopharmacol* 27, 337–342.
- Kim, Y.K., Lee, H.J., Yang, J.C., Hwang, J.A., Yoon, H.K., 2009. A Tryptophan Hydroxylase 2 Gene Polymorphism is Associated with Panic Disorder. *Behav Genet* 39, 170–175.
- Kirchheiner, J., Lorch, R., Lebedeva, E., Seeringer, A., Roots, I., Sasse, J., et al., 2008. Genetic variants in FKBP5 affecting response to antidepressant drug treatment. *Pharmacogenomics* 9, 841–846.
- Konuk, N., Tekin, I.O., Ozturk, U., Atik, L., Atasoy, N., Bektas, S., et al., 2007. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in obsessive compulsive disorder. *Mediators Inflamm* 2007, 65704.
- Kovacs, M., 1992. *Children's Depression Inventory Manual*. New York : Multi-Health Syst.
- Krause, D., Matz, J., Weidinger, E., Wagner, J., Wildenauer, A., Obermeier, M., 2010. Association between intracellular infectious agents and Tourette's syndrome. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 260, 359-363.
- Kronenberg, S., Frisch, A., Rotberg, B., Carmel, M., Apter, A., Weizman, A., 2008. Pharmacogenetics of selective serotonin reuptake inhibitors in pediatric depression and anxiety. *Pharmacogenomics* 9, 1725–1736.
- Kumar, A., Williams, M. T., Chugani, H.T., 2015. Evaluation of basal ganglia and thalamic inflammation in children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection and Tourette syndrome: a positron emission tomographic (PET) study using 11C-[R]-PK11195. *J Child Neurol* 30, 749-756.
- Lebowitz, E.R., Motlagh, M.G., Katsovich, L., King, R.A., Lombroso, P.J., Grantz, H., et al., 2012. Tourette syndrome in youth with and without obsessive compulsive disorder and attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 21, 451–457.
- Leckman, J.F., Grice, D.E., Boardman, J., Zhang, H., Vitale, A., Bondi, C., et al., 1997. Symptoms of obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 154, 911–917.
- Leckman, J.F., Katsovich, L., Kawikova, I., Lin, H., Zhang, H., Krönig, H., et al., 2005. Increased serum levels of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha in Tourette's syndrome. *Biol Psychiatry* 57, 667–673.
- Lee, H.J., Cha, J.H., Ham, B.J., Han, C.S., Kim, Y.K., Lee, S.H., et al., 2004. Association between a G-protein beta 3 subunit gene polymorphism and the symptomatology and treatment responses of major depressive disorders. *Pharmacogenomics J* 4, 29–33.
- Lee, L.C., Zachary, A.A., Leffell, M.S., Newschaffer, C.J., Matteson, K.J., Tyler, J.D., et al., 2006. HLA-DR4 in Families With Autism. *Pediatr Neurol* 35, 303–307.
- Lekman, M., Laje, G., Charney, D., Rush, A.J., Wilson, A.F., Sorant, A.J.M., et al., 2008. The FKBP5-gene in depression and treatment response – an association study in the STAR*D-cohort. *Biol Psychiatry* 63, 1103–1110.
- Lenington, J.B., Coppola, G., Kataoka-Sasaki, Y., Fernandez, T. V., Palejev, D., Li, Y., Huttner, A., et al., 2016. Transcriptome analysis of the human striatum in Tourette Syndrome. *Biol Psychiatry* 79, 372–382.
- Lenze, E.J., Dixon, D., Nowotny, P., Lotrich, F.E., Doré, P.M., Pollock, B.G., et al., 2013. Escitalopram reduces attentional performance in anxious older adults with high-expression genetic variants at serotonin 2A and 1B receptors. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 279–288.

- Li, T., Underhill, J., Liu, X.H., Sham, P.C., Donaldson, P., Murray, R.M., et al., 2001. Transmission disequilibrium analysis of HLA class II DRB1, DQA1, DQB1 and DPB1 polymorphisms in schizophrenia using family trios from a Han Chinese population. *Schizophr Res* 49, 73–78.
- Licinio, J., O’Kirwan, F., Irizarry, K., Merriman, B., Thakur, S., Jepson, R., et al., 2004. Association of a corticotropin-releasing hormone receptor 1 haplotype and antidepressant treatment response in Mexican-Americans. *Mol Psychiatry* 9, 1075–1082.
- Liebowitz, M., Turner, S., Piacentini, J., Beidel, D., Clarvit, S., Davies, S., et al., 2002. Fluoxetine in Children and Adolescents With OCD: A Placebo-Controlled Trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41, 1431–1438.
- Lilic, D., Cant, A.J., Abinun, M., Calvert, J.E., Spickett, G.P., 1997. Cytokine production differs in children and adults. *Pediatr Res.* 42, 237–240.
- Liu, Z., Zhu, F., Wang, G., Xiao, Z., Tang, J., Liu, W., et al., 2007. Association study of corticotropin-releasing hormone receptor1 gene polymorphisms and antidepressant response in major depressive disorders. *Neurosci Lett* 414, 155–158.
- Llerena, A., Dorado, P., Berecz, R., González, A.P., Peñas-Lledó, E.M., 2004. Effect of CYP2D6 and CYP2C9 genotypes on fluoxetine and norfluoxetine plasma concentrations during steady-state conditions. *Eur J Clin Pharmacol* 59, 869–873.
- London, A., Cohen, M., Schwartz, M., 2013. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci* 7, 34.
- Lotrich, F.E., Pollock, B.G., 2005. Candidate genes for antidepressant response to selective serotonin reuptake inhibitors. *Neuropsychiatr Dis Treat* 1, 17–35.
- Luborsky, L., 1962. Clinician’s judgments of mental health: a proposed scale. *Arch Gen Psychiatry* 7, 407–417.
- Lucae, S., Ising, M., Horstmann, S., Baune, B.T., Arolt, V., Müller-Myhsok, B., et al., 2010. HTR2A gene variation is involved in antidepressant treatment response. *Eur Neuropsychopharmacol* 20, 65–68.
- Maes, M., 2001. The immunoregulatory effects of antidepressants. *Hum Psychopharmacol* 16, 95–103.
- Maes, M., Meltzer, H., Bosmans, E., 1994. Psychoimmune investigation in obsessive-compulsive disorder: assays of plasma transferrin, IL-2 and IL-6 receptor, and IL-1 beta and IL-6 concentrations. *Neuropsychobiology* 30, 57–60.
- Majchrzak-Celińska, A., Baer-Dubowska, W., 2017. Pharmacoepigenetics: an element of personalized therapy? *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 13, 387–398.
- Manoharan, A., Shewade, D.G., Rajkumar, R.P., Adithan, S., 2016. Serotonin transporter gene (SLC6A4) polymorphisms are associated with response to fluoxetine in south Indian major depressive disorder patients. *Eur J Clin Pharmacol* 72, 1215–1220.
- Marazziti, D., Mungai, F., Masala, I., Baroni, S., Vivarelli, L., Ambrogio, F., et al., 2009. Normalisation of immune cell imbalance after pharmacological treatments of patients suffering from obsessive-compulsive disorder. *J Psychopharmacol* 23, 567–573.
- Marazziti, D., Presta, S., Pfanner, C., Gemignani, A., Rossi, A., Sbrana, S., et al., 1999. Immunological alterations in adult obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 46, 810–814.
- Martino, D., Zis, P., Buttiglione, M., 2015. The role of immune mechanisms in Tourette syndrome. *Brain Res* 1617, 126–143.
- Mas, S., Gassó, P., Lafuente, A., 2015. Pharmacogenomics Applicability of gene expression and systems biology to develop pharmacogenetic predictors; antipsychotic. *Pharmacogenomics* 16, 1975–1988.
- Mas, S., Lafuente, A., 2009. Pharmacogenetics strategies: From candidate genes to whole-genome association analysis. Exploratory or confirmatory studies? *Curr Pharmacogenomics Person Med* 7, 59–69.

- Mas, S., Pagerols, M., Gassó, P., Ortiz, A., Rodriguez, N., Morer, A., P et al., 2014. Role of GAD2 and HTR1B genes in early-onset obsessive-compulsive disorder: Results from transmission disequilibrium study. *Genes Brain Behav* 13, 409–417.
- Mas, S., Plana, M.T., Castro-Fornieles, J., Gassó, P., Lafuente, A., Moreno, E., et al., 2013. Common genetic background in anorexia nervosa and obsessive compulsive disorder: Preliminary results from an association study. *J Psychiatr Res* 47, 747–754.
- Masi, G., Millepiedi, S., Perugi, G., Pfanner, C., Berloffia, S., Pari, C., et al., 2010. A naturalistic exploratory study of the impact of demographic, phenotypic and comorbid features in pediatric obsessive-compulsive disorder. *Psychopathology* 43, 69–78.
- Mataix-Cols, D., Boman, M., Monzani, B., Rück, C., Serlachius, E., Långström, N., et al., 2013. Population-based, multi-generational family clustering study of obsessive-compulsive disorder. *JAMA Psychiatry* 70, 709–717.
- Mataix-Cols, D., do Rosario-Campos, M.C., Leckman, J.F., 2005. A Multidimensional Model of Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Psychiatry* 162, 228–238.
- Mattheisen, M., Samuels, J.F., Wang, Y., Benjamin, D., Fyer, A.J., Mccracken, J.T., et al., 2015. Genome-Wide Association Study in Obsessive-Compulsive Disorder : Results from the OCGAS. *Mol Psychiatry* 20, 337–344.
- Matz, J., Krause, D.L., Dehning, S., Riedel, M., Gruber, R., Schwarz, M.J., et al., 2012. Altered monocyte activation markers in Tourette’s syndrome: a case-control study. *BMC Psychiatry* 12, 29.
- Micali, N., Heyman, I., Perez, M., Hilton, K., Nakatani, E., Turner, C., et al., 2010. Long-term outcomes of obsessive-compulsive disorder: Follow-up of 142 children and adolescents. *Br J Psychiatry* 197, 128–134.
- Milad, M.R., Rauch, S.L., 2012. Obsessive Compulsive Disorder: Beyond Segregated Cortico- striatal Pathways. *Trends Cogn Sci* 16, 43–51.
- Miller, A.H., Haroon, E., Raison, C.L., Felger, J.C., 2013. Cytokine Targets in the Brain: Impact on Neurotransmitters and Neurocircuits. *Depress Anxiety* 30, 297–306.
- Miller, A.H., Maletic, V., Raison, C.L., 2009. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* 65, 732–741.
- Miman, O., Mutlu, E.A., Ozcan, O., Atambay, M., Karlidag, R., Unal, S., 2010. Is there any role of *Toxoplasma gondii* in the etiology of obsessive-compulsive disorder? *Psychiatry Res* 177, 263–265.
- Minguez, P., Dopazo, J., 2010. Functional genomics and networks: new approaches in the extraction of complex gene modules. *Expert Rev Proteomics* 7, 55–63.
- Mitjans, M., Gastó, C., Catalán, R., Fañanás, L., Arias, B., 2012. Genetic variability in the endocannabinoid system and 12-week clinical response to citalopram treatment: the role of the CNR1, CNR2 and FAAH genes. *J Psychopharmacol* 26, 1391–1398.
- Mitjans, M., Serretti, A., Fabbri, C., Gastó, C., Catalán, R., Fañanás, L., et al., 2013. Screening genetic variability at the CNR1 gene in both major depression etiology and clinical response to citalopram treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 227, 509–519.
- Miyadera, H., Tokunaga, K., 2015. Associations of human leukocyte antigens with autoimmune diseases: Challenges in identifying the mechanism. *J Hum Genet* 60, 697–702.
- Monteleone, P., Catapano, F., Fabrazzo, M., Tortorella, A., Maj, M., 1998. Decreased blood levels of tumor necrosis factor-alpha in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 37, 182–185.
- Moore, J.H., Williams, S.M., 2009. Epistasis and Its Implications for Personal Genetics. *Am J Hum Genet* 85, 309–320.
- Morer, A., Chae, W., Henegariu, O., Bothwell, A.L.M., Leckman, J.F., Kawikova, I., 2010. Elevated expression of MCP-1, IL-2 and PTPR-N in basal ganglia of Tourette syndrome cases. *Brain Behav Immun* 24, 1069–1073.

- Morer, A., Lázaro, L., Sabater, L., Massana, J., Castro, J., Graus, F., 2008. Antineuronal antibodies in a group of children with obsessive-compulsive disorder and Tourette syndrome. *J Psychiatr Res* 42, 64–68.
- Mössner, R., Walitza, S., Geller, F., Scherag, A., Gutknecht, L., Jacob, C., 2006. Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 9, 437-342.
- Murphy, G.M., Sarginson, J.E., Ryan, H.S., O’Hara, R., Schatzberg, A.F., Lazzeroni, L.C., 2013. BDNF and CREB1 genetic variants interact to affect antidepressant treatment outcomes in geriatric depression. *Pharmacogenet Genomics* 23, 301–313.
- Myung, W., Lim, S.W., Kim, S., Kim, H., Chung, J.W., Seo, M.Y., et al., 2013. Serotonin transporter genotype and function in relation to antidepressant response in Koreans. *Psychopharmacology (Berl)* 225, 283–290.
- Na, K.S., Lee, K.J., Lee, J.S., Cho, Y.S., Jung, H.Y., 2014. Efficacy of adjunctive celecoxib treatment for patients with major depressive disorder: A meta-analysis. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 48, 79–85.
- Nagarajan, N., Jones, B.W., West, P.J., Marc, R.E., Capecchi, M.R., 2017a. Corticostriatal circuit defects in Hoxb8 mutant mice. *Mol Psychiatry* doi:10.1038/mp.2017.180.
- Nagarajan, N., Jones, B.W., West, P.J., Marc, R.E., Capecchi, M.R., 2017b. Corticostriatal circuit defects in Hoxb8 mutant mice. *Mol Psychiatry* doi:10.1038/mp.2017.251.
- Nakagawa, Y., Chiba, K., 2014. Role of microglial M1/M2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals* 7, 1028–1048.
- Nakao, T., Okada, K., Kanba, S., 2014. Neurobiological model of obsessive-compulsive disorder: Evidence from recent neuropsychological and neuroimaging findings. *Psychiatry Clin Neurosci* 68, 587–605.
- Narayanaswamy, J.C., Viswanath, B., Veshnal Cherian, A., Bada Math, S., Kandavel, T., Janardhan Reddy, Y.C., 2012. Impact of age of onset of illness on clinical phenotype in OCD. *Psychiatry Res* 200, 554-559.
- Neumaier, J.F., Root, D.C., Hamblin, M.W., 1996. Chronic fluoxetine reduces serotonin transporter mRNA and 5-HT(1B) mRNA in a sequential manner in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 15, 515-522.
- Nicholson, T.R.J., Ferdinando, S., Krishnaiah, R.B., Anhoury, S., Lennox, B.R., Mataix-Cols, D., et al., 2012. Prevalence of anti-basal ganglia antibodies in adult obsessive-compulsive disorder: cross-sectional study. *Br J Psychiatry* 200, 381–386.
- Nonen, S., Kato, M., Takekita, Y., Wakeno, M., Sakai, S., Serretti, A., et al., 2016. Polymorphism of rs3813034 in Serotonin Transporter Gene SLC6A4 Is Associated With the Selective Serotonin and Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitor Response in Depressive Disorder. *J Clin Psychopharmacol* 36, 27–31.
- Okada, S., Morinobu, S., Fuchikami, M., Segawa, M., Yokomaku, K., Kataoka, T., et al., 2014. The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. *J Psychiatr Res* 53, 47–53.
- Ortiz, A.E., Gassó, P., Mas, S., Falcon, C., Bargalló, N., Lafuente, A., et al., 2015. Association between genetic variants of serotonergic and glutamatergic pathways and the concentration of neurometabolites of the anterior cingulate cortex in paediatric patients with obsessive–compulsive disorder. *World J Biol Psychiatry* 17, 394-404.
- Ortiz, A.E., Morer, A., Moreno, E., Plana, M.T., Cordovilla, C., Lázaro, L., 2016. Clinical significance of psychiatric comorbidity in children and adolescents with obsessive–compulsive disorder: subtyping a complex disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 266, 199–208.
- Öst, L.G., Havnen, A., Hansen, B., Kvale, G., 2015. Cognitive behavioral treatments of obsessive–compulsive disorder. A systematic review and meta-analysis of studies published 1993–2014. *Clin Psychol Rev* 40, 156–169.

- Paddock, S., Laje, G., Charney, D., Rush, A.J., Wilson, A.F., Sorant, A.J.M., et al., 2007. Association of GRIK4 with outcome of antidepressant treatment in the STAR*D cohort. *Am J Psychiatry* 164, 1181–1188.
- Padmos, R.C., Hillegers, M.H.J., Knijff, E.M., Vonk, R., Bouvy, A., Staal, F.J.T., et al., 2008. A Discriminating Messenger RNA Signature for Bipolar Disorder Formed by an Aberrant Expression of Inflammatory Genes in Monocytes. *Arch Gen Psychiatry* 65, 395–407.
- Parmar, A., Sarkar, S., 2016. Neuroimaging studies in obsessive compulsive disorder: A narrative review. *Indian J Psychol Med* 38, 386–394.
- Pascual, M., Nieto, A., López-Nevot, M.A., Ramal, L., Matarán, L., Caballero, A., et al., 2001. Rheumatoid arthritis in southern Spain: Toward elucidation of a unifying role of the HLA class II region in disease predisposition. *Arthritis Rheum* 44, 307–314.
- Pauls, D.L., 2010. The genetics of obsessive-compulsive disorder: a review. *Dialogues Clin Neurosci* 12, 149–163.
- Pauls, D.L., Abramovitch, A., Rauch, S.L., Geller, D.A., 2014. Obsessive-compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. *Nat Rev Neurosci* 15, 410–424.
- Pearlman, D.M., Vora, H.S., Marquis, B.G., Najjar, S., Dudley, L.A., 2014. Anti-basal ganglia antibodies in primary obsessive-compulsive disorder: Systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry* 205, 8–16.
- Perani, D., Garibotto, V., Gorini, A., Moresco, R.M., Henin, M., Panzacchi, A., et al., 2008. In vivo PET study of 5HT2A serotonin and D2 dopamine dysfunction in drug-naïve obsessive-compulsive disorder. *Neuroimage* 42, 306–314.
- Perez-Caballero, L., Torres-Sanchez, S., Bravo, L., Mico, J.A., Berrocoso, E., 2014. Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. *Expert Opin Drug Discov* 9, 567–578.
- Perlis, R.H., Fijal, B., Adams, D.H., Sutton, V.K., Trivedi, M.H., Houston, J.P., 2009. Variation in Catechol-O-Methyltransferase Is Associated with Duloxetine Response in a Clinical Trial for Major Depressive Disorder. *Biol Psychiatry* 65, 785–791.
- Perlis, R.H., Fijal, B., Dharia, S., Houston, J.P., 2013. Pharmacogenetic investigation of response to duloxetine treatment in generalized anxiety disorder. *Pharmacogenomics J* 13, 280–285.
- Perroud, N., Bondolfi, G., Uher, R., Gex-Fabry, M., Aubry, J.M., Bertschy, G., et al., 2011. Clinical and genetic correlates of suicidal ideation during antidepressant treatment in a depressed outpatient sample. *Pharmacogenomics* 12, 365–377.
- Peters, E.J., Slager, S.L., Kraft, J.B., Jenkins, G.D., Reinalda, M.S., McGrath, P.J., et al., 2008. Pharmacokinetic genes do not influence response or tolerance to citalopram in the STAR*D sample. *PLoS One* 3, e1872.
- Peters, E.J., Slager, S.L., McGrath, P.J., Knowles, J.A., Hamilton, S.P., 2004. Investigation of serotonin-related genes in antidepressant response. *Mol Psychiatry* 9, 879–889.
- Pinto, A., Mancebo, M.C., Eisen, J.L., Pagano, M.E., Rasmussen, S.A., 2006. The Brown Longitudinal Obsessive Compulsive Study: Clinical features and symptoms of the sample at intake. *J Clin Psychiatry* 67, 703–711.
- Porcelli, S., Drago, A., Fabbri, C., Gibiino, S., Calati, R., Serretti, A., 2011. Pharmacogenetics of antidepressant response. *J Psychiatry Neurosci* 2011;36(2)87-113. 36, 87–113.
- Prata, J., Santos, S.G., Almeida, M.I., Coehlo, R., Barbosa, M.A., 2017. Bridging autism spectrum disorders and schizophrenia through inflammation and biomarkers – pre-clinical and clinical investigations. *J Neuroinflammation* 14: 179
- Prinz, M., Priller, J., 2014. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 15, 300–12.
- Pu, M., Zhang, Z., Xu, Z., Shi, Y., Geng, L., Yuan, Y., et al., 2013. Influence of genetic polymorphisms in the glutamatergic and GABAergic systems and their interactions with environmental stressors on antidepressant response. *Pharmacogenomics* 14, 277–288.

- Rao, N.P., Venkatasubramanian, G., Ravi, V., Kalmady, S., Cherian, A., Yc, J.R., 2015. Plasma cytokine abnormalities in drug-naive, comorbidity-free obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res* 229, 949–952.
- Real, E., Gratacòs, M., Soria, V., Escaramís, G., Alonso, P., Segalàs, C., et al., 2009. A Brain-Derived Neurotrophic Factor Haplotype Is Associated with Therapeutic Response in Obsessive-Compulsive Disorder *Biol Psychiatry* 66, 674–680.
- Rosa-Alcázar, A.I., Iniesta-Sepúlveda, M., Rosa-Alcázar, A., 2013. Pharmacological treatments for obsessive-compulsive disorder in children and adolescents: a qualitative review. *Actas españolas Psiquiatr* 41, 196–203.
- Rosa-Alcázar, A.I., Sánchez-Meca, J., Gómez-Conesa, A., Marín-Martínez, F., 2008. Psychological treatment of obsessive-compulsive disorder: A meta-analysis. *Clin Psychol Rev* 28, 1310–1325.
- Rosario-Campos, M.C., Leckman, J.F., Mercadante, M.T., Shavitt, R.G., Prado, H.S., Sada, P., et al., 2001. Adults with early onset obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 158, 1899–1903.
- Rosenberg, D.R., MacMaster, F.P., Keshavan, M.S., Fitzgerald, K.D., Stewart, C.M., Moore, G.J., 2000. Decrease in Caudate Glutamatergic Concentrations in Pediatric Obsessive-Compulsive Disorder Patients Taking Paroxetine. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39, 1096–1103.
- Rotberg, B., Kronenberg, S., Carmel, M., Frisch, A., Brent, D., Zalsman, G., A et al., 2013. Additive Effects of 5-HTTLPR (Serotonin Transporter) and Tryptophan Hydroxylase 2 G-703T Gene Polymorphisms on the Clinical Response to Citalopram among Children and Adolescents with Depression and Anxiety Disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 23, 117–122.
- Rotge, J.Y., Aouizerate, B., Tignol, J., Bioulac, B., Burbaud, P., Guehl, D., 2010. The glutamate-based genetic immune hypothesis in obsessive-compulsive disorder. An integrative approach from genes to symptoms. *Neuroscience* 165, 408–417.
- Ruscio, A.M., Stein, D.J., Chiu, W.T, Kessler, R.C, 2010. The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Mol Psychiatry* 15, 53–63.
- Sallakci, N., Akcurin, G., Köksoy, S., Kardelen, F., Uguz, A., Coskun, M., et al., 2005. TNF-alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF-alpha production. *J Autoimmun* 25, 150–154.
- Sanders, A.R., Duan, J., Gejman, P. V, 2002. DNA variation and psychopharmacology of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. *Pharmacogenomics* 3, 745–762.
- Saxena, S., Rauch, S.L., 2000. Functional neuroimaging and the neuroanatomy of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am* 23, 563–586.
- Sayeh, A., Cheikh, C.B., Mrad, M., Lakhali, N., Gritli, N., Galelli, S., et al., 2014. Association of HLA-DR/DQ polymorphisms with schizophrenia in Tunisian patients. *Ann Saudi Med* 34, 503–507.
- Scahill, L., Riddle, M.A., McSwiggin-Hardin, M., Ort, S.I., King, R.A., Goodman, W.K., et al., 1997. Children's Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale: Reliability and Validity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36, 844–852.
- Schatzberg, A.F., DeBattista, C., Lazzaroni, L.C., Etkin, A., Murphy, G.M., Williams, L.M., 2015. ABCB1 genetic effects on antidepressant outcomes: A report from the iSPOT-D trial. *Am J Psychiatry* 172, 751–759.
- Scordo, M.G., Spina, E., Dahl, M.L., Gatti, G., Perucca, E., 2005. Influence of CYP2C9, 2C19 and 2D6 genetic polymorphisms on the steady-state plasma concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97, 296–301.
- Serretti, A., Lorenzi, C., Cusin, C., Zanardi, R., Lattuada, E., Rossini, D., et al., 2003. SSRIs antidepressant activity is influenced by G beta 3 variants. *Eur Neuropsychopharmacol* 13, 117–122.
- Serretti, A., Zanardi, R., Cusin, C., Rossini, D., Lorenzi, C., Smeraldi, E., 2001a. Tryptophan hydroxylase gene associated with paroxetine antidepressant activity. *Eur Neuropsychopharmacol* 11, 375–380.

- Serretti, A., Zanardi, R., Rossini, D., Cusin, C., Lilli, R., Smeraldi, E., 2001b. Influence of tryptophan hydroxylase and serotonin transporter genes on fluvoxamine antidepressant activity. *Mol Psychiatry* 6, 586–592.
- Shaffer, D., Gould, M.S., Brasic, J., Ambrosini, P., Fisher, P., Bird, H., et al., 1983. A children's global assessment scale (CGAS). *Arch Gen Psychiatry* 40, 1228–1231.
- Shanahan, N.A., Velez, L.P., Masten, V.L., Dulawa, S.C., 2011. Essential role for orbitofrontal serotonin 1b receptors in obsessive-compulsive disorder-like behavior and serotonin reuptake inhibitor response in mice. *Biol Psychiatry* 70, 1039–1048.
- Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H., Kulski, J.K., 2009. The HLA genomic loci map: Expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* 54, 15–39.
- Shishkina, G.T., Kalinina, T.S., Dygalo, N.N., 2007. Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect. *Neuroscience* 150, 404–412.
- Şimşek, Ş., Yüksel, T., Çim, A., Kaya, S., 2016. Serum cytokine profiles of children with obsessive-compulsive disorder shows the evidence of autoimmunity. *Int J Neuropsychopharmacol* 19, 1–6.
- Skoog, G., Skoog, I., 1999. A 40-year follow-up of patients with obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 56, 121–127.
- Sookman, D., Fineberg, N.A., 2015. Specialized psychological and pharmacological treatments for obsessive-compulsive disorder throughout the lifespan: A special series by the Accreditation Task Force (ATF) of The Canadian Institute for Obsessive Compulsive Disorders (CIOCD, www.ciocd.ca). *Psychiatry Res* 227, 74–77.
- Soomro, G.M., 2012. Obsessive compulsive disorder. *BMJ Clin Evid* 2012, 1004.
- Stein, D.J., Fineberg, N.A., Bienvenu, O.J., Denys, D., Lochner, C., Nestadt, G., et al., 2010. Should ocd be classified as an anxiety disorder in DSM-V? *Depress Anxiety* 27, 495–506.
- Stewart, S.E., Yu, D., Scharf, J.M., Neale, B.M., Fagerness, J.A., Mathews, C.A., et al., 2013. Genome-wide association study of obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry* 18, 788–798.
- Stewart, S.E., Geller, D.A., Jenike, M., Pauls, D., Shaw, D., Mullin, B., et al., 2004. Long-term outcome of pediatric obsessive-compulsive disorder: a meta-analysis and qualitative review of the literature. *Acta Psychiatr Scand* 110, 4–13.
- Su, Y.A., Li, J.T., Dai, W.J., Liao, X.M., Dong, L.C., Lu, T.L., et al., 2016. Genetic variation in the tryptophan hydroxylase 2 gene moderates depressive symptom trajectories and remission over 8 weeks of escitalopram treatment. *Int Clin Psychopharmacol* 31, 127–133.
- Sun, H.F.S., Chang, Y.T., Fann, C.S.J., Chang, C.J., Chen, Y.H., Hsu, Y.P., et al., 2002. Association study of novel human serotonin 5-HT1B polymorphisms with alcohol dependence in Taiwanese Han. *Biol Psychiatry* 51, 896–901.
- Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Takebayashi, K., et al., 2013. Microglial Activation in Young Adults With Autism Spectrum Disorder. *JAMA Psychiatry* 70, 49–58.
- Swedo, S.E., Rapoport, J.L., Cheslow, D.L., Leonard, H.L., Ayoub, E.M., Hosier, D.M., et al., 1989. High-Prevalence of Obsessive-Compulsive Symptoms in Patients with Sydenham's Chorea. *Am J Psychiatry* 146, 246–249.
- Swedo, S.E., 2002. Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections (PANDAS). *Mol Psychiatry* 7, S24–S25.
- Swedo, S.E., Leckman, J.F., Rose, N.R., 2012. From research subgroup to clinical syndrome: modifying the PANDAS criteria to describe PANS (Pediatric Acute-onset Neuropsychiatric Syndrome). *Pediatr Ther* 2, 113.
- Swedo, S.E., Leonard, H.L., Garvey, M., Mittleman, B., Allen, A.J., Perlmutter, S., et al., 1998. Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: clinical description of the first 50 cases. *Am J Psychiatry* 155, 264–71.

- Sweeten, T.L., Posey, D.J., McDougle, C.J., 2003. High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. *Am J Psychiatry* 160, 1691–1693.
- Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., et al., 2017. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45, D362–D368.
- Szyf, M., 2011. DNA methylation, the early-life social environment and behavioral disorders. *J Neurodev Disord* 3, 238–249.
- Tadić, A., Müller, M.J., Rujescu, D., Kohnen, R., Stassen, H.H., Dahmen, N., et al., 2007. The MAOA T941G polymorphism and short-term treatment response to mirtazapine and paroxetine in major depression. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 144B, 325–331.
- Takahashi, Y., Yu, Z., Sakai, M., Tomita, H., 2016. Linking Activation of Microglia and Peripheral Monocytic Cells to the Pathophysiology of Psychiatric Disorders. *Front Cell Neurosci* 10, 144.
- Takano, T., 2015. Role of Microglia in Autism: Recent Advances. *Dev Neurosci* 37, 195–202.
- Takeuchi, N., Nonen, S., Kato, M., Wakeno, M., Takekita, Y., Kinoshita, T., et al., 2017. Therapeutic Response to Paroxetine in Major Depressive Disorder Predicted by DNA Methylation. *Neuropsychobiology* 75, 81–88.
- Tansey, K.E., Guipponi, M., Hu, X., Domenici, E., Lewis, G., Malafosse, A., et al., 2013. Contribution of common genetic variants to antidepressant response. *Biol Psychiatry* 73, 679–682.
- Tatarczyńska, E., Kłodzińska, A., Stachowicz, K., Chojnacka-Wójcik, E., 2004. Effect of combined administration of 5-HT1A or 5-HT1B/1D receptor antagonists and antidepressants in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 487, 133–142.
- Taylor, S., 2016. Disorder-specific genetic factors in obsessive-compulsive disorder: A comprehensive meta-analysis. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 171B, 325–332.
- Taylor, S., 2013. Molecular genetics of obsessive-compulsive disorder: A comprehensive meta-analysis of genetic association studies. *Mol Psychiatry* 18, 799–805.
- Taylor, S., 2011. Early versus late onset obsessive-compulsive disorder: Evidence for distinct subtypes. *Clin Psychol Rev* 31, 1083–1100.
- Taylor, S., Jang, K.L., Asmundson, G.J.G., 2010. Etiology of obsessions and compulsions: a behavioral-genetic analysis. *J Abnorm Psychol* 119, 672–682.
- Teixeira, A.L., Rodrigues, D.H., Marques, A.H., Miguel, E.C., Fontenelle, L.F., 2014. Searching for the immune basis of obsessive-compulsive disorder. *Neuroimmunomodulation* 21, 152–158.
- Torres, A.R., Maciulis, A., Stubbs, E.G., Cutler, A., Odell, D., 2002. The transmission disequilibrium test suggests that HLA-DR4 and DR13 are linked to autism spectrum disorder. *Hum Immunol* 63, 311–316.
- Torres, A.R., Sweeten, T.L., Johnson, R.C., Odell, D., Westover, J.B., Bray-Ward, P., et al., 2016. Common genetic variants found in HLA and KIR immune genes in autism spectrum disorder. *Front Neurosci* 10, 463.
- Tost, J., Gut, I.G., 2007. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* 2, 2265–2275.
- Tsai, S.J., Gau, Y.T., Hong, C.J., Liou, Y.J., Yu, Y.W.Y., Chen, T.J., 2009a. Sexually dimorphic effect of catechol-O-methyltransferase val158met polymorphism on clinical response to fluoxetine in major depressive patients. *J Affect Disord* 113, 183–187.
- Tsai, S.J., Hong, C.J., Liou, Y.J., Yu, Y.W.Y., Chen, T.J., Hou, S.J., et al., 2009b. Tryptophan hydroxylase 2 gene is associated with major depression and antidepressant treatment response. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 33, 637–641.
- Tsai, S.J., Hong, C.J., Yu, Y.W.Y., Chen, T.J., Wang, Y.C., Lin, W.K., 2004. Association study of serotonin 1B receptor (A-161T) genetic polymorphism and suicidal behaviors and response to fluoxetine in major depressive disorder. *Neuropsychobiology* 50, 235–238.

- Uher, R., Perroud, N., Ng, M.Y.M., Hauser, J., Henigsberg, N., Maier, W., et al., 2010. Genome-wide pharmacogenetics of antidepressant response in the GENDEP project. *Am J Psychiatry* 167, 555–564.
- Ulloa, R.E., Ortiz, S., Higuera, F., Nogales, I., Fresán, A., Apiquian, R., et al., 2006. Interrater reliability of the Spanish version of Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime version (K-SADS-PL). *Actas Esp Psiquiatr* 34, 36–40.
- Usala, T., Clavenna, A., Zuddas, A., Bonati, M., 2008. Randomised controlled trials of selective serotonin reuptake inhibitors in treating depression in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Eur Neuropsychopharmacol* 18, 62–73.
- Vidal, S., Morante, M., Moga, E., Mosquera, A.M., Querol, S., Garcia, J., et al., 2002. Molecular analysis of HLA-DRB1 polymorphism in north-east Spain. *Eur J Immunogenet* 29, 75–77.
- Villafuerte, S.M., Vallabhaneni, K., Śliwerska, E., McMahon, F.J., Young, E. a, Burmeister, M., 2009. SSRI response in depression may be influenced by SNPs in HTR1B and HTR1A. *Psychiatr Genet* 19, 281–291.
- Vulink, N.C.C., Westenberg, H.G.M., van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Fluitman, S.B.A.H.A., Meinardi, J.S.C., et al., 2012. Catechol-O-methyltransferase gene expression is associated with response to citalopram in obsessive-compulsive disorder. *Int J Psychiatry Clin Pract* 16, 277–283.
- Waisman, A., Ginhoux, F., Greter, M., Bruttger, J., 2015. Homeostasis of microglia in the adult brain: review of novel microglia depletion systems. *Trends Immunol* 36, 625–636.
- Walitzka, S., Wendland, J.R., Gruenblatt, E., Warnke, A., Sontag, T.A., Tucha, O., et al., 2010. Genetics of early-onset obsessive-compulsive disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19, 227–235.
- Walsh, E.C., Mather, K.A., Schaffner, S.F., Farwell, L., Daly, M.J., Patterson, N., et al., 2003. An integrated haplotype map of the human major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet* 73, 580–590.
- Wanderer, S., Roessner, V., Freeman, R., Bock, N., Rothenberger, A., Becker, A., 2012. Relationship of Obsessive-Compulsive Disorder to Age-Related Comorbidity in Children and Adolescents With Tourette Syndrome. *J Dev Behav Pediatr* 33, 124–133.
- Warren, R.P., Odell, J.D., Warren, W.L., Burger, R.A., Maciulis, A., Daniels, W.W., et al., 1996. Strong association of the third hypervariable region of HLA-DRβ1 with autism. *J Neuroimmunol* 67, 97–102.
- Weizman, R., Laor, N., Barber, Y., Hermesh, H., Notti, I., Djaldetti, M., et al., 1996. Cytokine production in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 40, 908–912.
- Wewetzer, C., Jans, T., Müller, B., Neudörfl, A., Bücherl, U., Remschmidt, H., 2001. Long-term outcome and prognosis of obsessive-compulsive disorder with onset in childhood or adolescence. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 10, 37–46.
- Wilkie, M.J.V., Smith, D., Reid, I.C., Day, R.K., Matthews, K., Wolf, C.R., et al., 2007. A splice site polymorphism in the G-protein β subunit influences antidepressant efficacy in depression. *Pharmacogenet Genomics* 17, 207–215.
- Wilkie, M.J. V, Smith, G., Day, R.K., Matthews, K., Smith, D., Blackwood, D., et al., 2009. Polymorphisms in the SLC6A4 and HTR2A genes influence treatment outcome following antidepressant therapy. *Pharmacogenomics J* 9, 61–70.
- Williams, D.W., Eugenin, E. a., Calderon, T.M., Berman, J.W., 2012. Monocyte maturation, HIV susceptibility, and transmigration across the blood brain barrier are critical in HIV neuropathogenesis. *J Leukoc Biol* 91, 401–415.
- Wohleb, E.S., McKim, D.B., Sheridan, J.F., Godbout, J.P., 2015. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: A novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Front Neurosci* 8, 447.
- Wong, K.L., Tai, J.J.Y., Wong, W.C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.H., et al., 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, e16–e31.

- Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., Wong, S.C., 2012. The three human monocyte subsets: Implications for health and disease. *Immunol Res* 53, 41–57.
- Wu, K., Hanna, G.L., Rosenberg, D.R., Arnold, P.D., 2012. The Role of Glutamate Signalling in the Pathogenesis and Treatment of Obsessive-Compulsive Disorder. *Pharmacol Biochem Behav* 100, 726–735.
- Xu, Z., Zhang, Z., Shi, Y., Pu, M., Yuan, Y., Zhang, X., et al., 2012. Influence and interaction of genetic polymorphisms in the serotonin system and life stress on antidepressant drug response. *J Psychopharmacol* 26, 349–359.
- Yu, Y.W.-Y., Tsai, S.-J., Liou, Y.-J., Hong, C.-J., Chen, T.-J., 2006. Association study of two serotonin 1A receptor gene polymorphisms and fluoxetine treatment response in Chinese major depressive disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 16, 498–503.
- Yirmiya, R., Rimmerman, N., Reshef, R., 2015. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci* 38, 637–658.
- Yu, Y.W.-Y., Tsai, S.J., Chen, T.J., Lin, C.H., Hong, C.J., 2002. Association study of the serotonin transporter promoter polymorphism and symptomatology and antidepressant response in major depressive disorders. *Mol Psychiatry* 7, 1115–1119.
- Yu, Y.W.-Y., Tsai, S.J., Hong, C.J., Chen, T.J., Chen, M.C., Yang, C.W., 2005. Association study of a Monoamine oxidase A gene promoter polymorphism with major depressive disorder and antidepressant response. *Neuropsychopharmacology* 30, 1719–1723.
- Zai, G., Brandl, E.J., Müller, D.J., Richter, M.A., Kennedy, J.L., 2014. Pharmacogenetics of antidepressant treatment in obsessive-compulsive disorder: an update and implications for clinicians. *Pharmacogenomics* 15, 1147–1157.
- Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.R., Fliser, D., et al., 2011. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118, e50–e61.
- Ziegler-Heitbrock, L., 2007. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81, 584–592.
- Ziegler-Heitbrock, L., Hofer, T.P.J., 2013. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol* 4, 23.
- Zill, P., Buttner, A., Eisenmenger, W., Moller, H.J., Ackenheil, M., Bondy, B., 2007. Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: A post-mortem study. *J Psychiatr Res* 41, 168–173.
- Zou, Y.F., Wang, F., Feng, X.L., Li, W.F., Tao, J.H., Pan, F.M., et al., 2010. Meta-analysis of FKBP5 gene polymorphisms association with treatment response in patients with mood disorders. *Neurosci Lett* 484, 56–61.

ANEXOS

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1

Priorización de genes diferencialmente expresados (p-valor corregido por el método del FDR < 0.01, *fold change* absoluto ≥ 4 ; N=258) en monocitos en condiciones basales.

Gen	Estadístico	p-valor	p-valor corregido por FDR	Fold Change
ARPC2	8.46	1.94E-09	1.68E-05	7.10
COX6B1	8.18	4.00E-09	2.01E-05	6.49
PGD	8.02	5.95E-09	2.39E-05	6.27
HLA-DRB3	7.69	1.41E-08	3.79E-05	7.50
HLA-DRA	7.67	1.51E-08	3.79E-05	6.55
IFI30	7.47	2.56E-08	4.28E-05	12.31
HLA-DMA	7.48	2.48E-08	4.28E-05	8.33
ANXA2P2	7.42	2.89E-08	4.47E-05	22.45
CAPNS1	7.33	3.69E-08	5.29E-05	4.13
CYBB	7.26	4.40E-08	5.43E-05	11.11
ANXA2	7.19	5.34E-08	5.43E-05	6.32
ANXA11	7.23	4.84E-08	5.43E-05	5.64
PSMB3	7.21	5.11E-08	5.43E-05	4.34
SAMHD1	7.21	5.12E-08	5.43E-05	4.18
ACTR3	6.99	9.21E-08	7.37E-05	12.25
SLRP	7.00	8.98E-08	7.37E-05	6.89
FBP1	6.96	9.90E-08	7.37E-05	5.41
ACOT13	7.00	9.00E-08	7.37E-05	4.25
TALDO1	6.98	9.39E-08	7.37E-05	4.24
CYBA	6.93	1.07E-07	7.40E-05	8.20
MSN	6.75	1.77E-07	1.05E-04	6.99
ACTG1	6.69	2.07E-07	1.07E-04	6.48
EIF5A	6.72	1.91E-07	1.07E-04	5.93
ARHGDB	6.71	1.97E-07	1.07E-04	4.88
LCPI	6.66	2.27E-07	1.11E-04	7.63
HLA-DRB1	6.66	2.26E-07	1.11E-04	5.17
PSMA7	6.60	2.62E-07	1.25E-04	4.99
RNASEK	6.54	3.16E-07	1.38E-04	9.90
CAPG	6.54	3.12E-07	1.38E-04	5.75
CFL1	6.51	3.36E-07	1.41E-04	5.08
NDUFS6	6.51	3.36E-07	1.41E-04	4.68
PFN1	6.50	3.50E-07	1.43E-04	11.07
PFDN5	6.49	3.56E-07	1.43E-04	6.21
CALR	6.48	3.69E-07	1.45E-04	10.74
ACTB	6.45	3.99E-07	1.54E-04	7.82
CTSB	6.36	5.18E-07	1.82E-04	10.97
INSIG1	6.32	5.70E-07	1.82E-04	7.07
TMSB10	6.34	5.37E-07	1.82E-04	7.05
EMP3	6.37	5.04E-07	1.82E-04	5.45
CD74	6.33	5.60E-07	1.82E-04	5.02
UBL5	6.35	5.35E-07	1.82E-04	4.72
ALDOA	6.31	5.96E-07	1.83E-04	9.04
EEF1B2	6.27	6.61E-07	1.92E-04	4.38
ITGB2	6.26	6.72E-07	1.93E-04	9.51
TPI1	6.26	6.81E-07	1.93E-04	7.37
EDARADD	6.19	8.22E-07	2.27E-04	21.15
VIM	6.18	8.58E-07	2.27E-04	17.22
LGALS3	6.17	8.68E-07	2.27E-04	10.48
RPS21	6.18	8.43E-07	2.27E-04	7.73
CD63	6.17	8.77E-07	2.27E-04	4.65
SH3BGRL3	6.12	1.01E-06	2.42E-04	7.50
RAC2	6.07	1.15E-06	2.46E-04	5.86
C19orf43	6.09	1.10E-06	2.46E-04	5.08
CORO1A	6.07	1.14E-06	2.46E-04	4.30
SPG21	6.06	1.18E-06	2.50E-04	4.35
STAB1	6.04	1.24E-06	2.54E-04	4.41
SLC25A6	6.00	1.40E-06	2.71E-04	4.44
CD81	5.92	1.74E-06	2.91E-04	5.08
GNB2L1	5.92	1.76E-06	2.92E-04	6.64
NDUFS5	5.91	1.81E-06	2.97E-04	4.14
EIF4G2	5.89	1.91E-06	3.04E-04	5.79
PSAP	5.88	1.95E-06	3.06E-04	10.18
PABPC1	5.88	1.96E-06	3.06E-04	5.30
RAB7A	5.88	1.98E-06	3.06E-04	4.92
H2AFY	5.87	2.04E-06	3.08E-04	9.10
ANXA5	5.85	2.15E-06	3.17E-04	6.44
PRDX1	5.83	2.23E-06	3.20E-04	11.81
GPI	5.83	2.25E-06	3.20E-04	6.21
METTL9	5.83	2.24E-06	3.20E-04	4.08
PSMB1	5.82	2.31E-06	3.24E-04	6.07
MBNL1	5.81	2.35E-06	3.25E-04	4.11
HLA-DMB	5.78	2.55E-06	3.35E-04	4.53
GNG5	5.77	2.70E-06	3.43E-04	5.88
PSMC5	5.76	2.76E-06	3.48E-04	4.70
SQSTM1	5.71	3.16E-06	3.69E-04	4.57
GNAI2	5.71	3.16E-06	3.69E-04	4.48
CTBP1	5.70	3.26E-06	3.77E-04	7.05
LTA4H	5.67	3.50E-06	3.91E-04	5.53
TUBA1A	5.63	3.94E-06	4.17E-04	4.34
UXT	5.62	4.04E-06	4.23E-04	4.37
CYP27A1	5.62	4.10E-06	4.25E-04	5.54
CSTB	5.59	4.48E-06	4.29E-04	20.90
RNF130	5.59	4.45E-06	4.29E-04	7.73
CD53	5.59	4.39E-06	4.29E-04	4.94
SMAP2	5.60	4.31E-06	4.29E-04	4.08
RPL7A	5.58	4.61E-06	4.31E-04	4.33
EIF4H	5.57	4.70E-06	4.33E-04	4.03
PLA2G7	5.56	4.83E-06	4.33E-04	6.58
BOLA2	5.56	4.82E-06	4.33E-04	6.20
EIF3E	5.56	4.81E-06	4.33E-04	4.46
CTSD	5.55	4.94E-06	4.39E-04	4.58
SEC61B	5.54	5.09E-06	4.43E-04	4.32
IER3	5.51	5.48E-06	4.49E-04	13.51
ATP6V0E1	5.50	5.65E-06	4.49E-04	7.75
LSP1	5.50	5.73E-06	4.49E-04	7.04
TMEM179B	5.50	5.65E-06	4.49E-04	5.07
SDCBP	5.52	5.46E-06	4.49E-04	5.00
UFCl	5.50	5.69E-06	4.49E-04	4.70
MOB1A	5.51	5.49E-06	4.49E-04	4.18
DNAJC7	5.46	6.29E-06	4.63E-04	5.36
TUBA1B	5	6.57E-06	4.71E-04	4.83
TUBA1C	5.43	6.87E-06	4.83E-04	4.81
RHOA	5.43	6.98E-06	4.89E-04	4.07
ATP6V0B	5.42	7.12E-06	4.95E-04	7.00
SF3B5	5.40	7.57E-06	5.17E-04	4.58
LEPROT	5.40	7.60E-06	5.18E-04	4.09
SDHB	5.38	7.96E-06	5.27E-04	4.70
PARK7	5.36	8.36E-06	5.33E-04	5.15
RPS11	5.35	8.71E-06	5.45E-04	4.34
GNMB	5.35	8.74E-06	5.45E-04	5.69
DNMT1	5.34	9.02E-06	5.58E-04	5.67
MMP9	5.33	9.12E-06	5.60E-04	8.61
LIMS1	5.32	9.43E-06	5.69E-04	5.85
KIAA0391	5.30	1.00E-05	5.87E-04	4.76
NTAN1	5.30	1.01E-05	5.89E-04	4.00
TXN	5.29	1.02E-05	5.89E-04	6.85
GNAS	5.29	1.02E-05	5.89E-04	6.40
RPS5	5.30	1.01E-05	5.89E-04	4.84
RPL35	5.28	1.05E-05	5.98E-04	4.60
ENO1	5.27	1.09E-05	6.12E-04	5.81
ATP6V1B2	5.27	1.10E-05	6.13E-04	4.50
CYP1B1	5.26	1.13E-05	6.17E-04	5.39
HVCN1	5.26	1.13E-05	6.17E-04	4.15
ATP6V0C	5.24	1.17E-05	6.30E-04	7.49
RPLP1	5.23	1.20E-05	6.41E-04	4.08
FTH1	5.20	1.32E-05	6.53E-04	5.87
IL2RG	5.21	1.30E-05	6.53E-04	4.84
CD68	5.20	1.32E-05	6.53E-04	4.83
DPYSL2	5.20	1.31E-05	6.53E-04	4.41

Priorización de genes diferencialmente expresados (p-valor corregido por el método del FDR < 0.01, *fold change* absoluto ≥ 4 ; N=258) en monocitos en condiciones basales.

ARL6IP5	5.21	1.30E-05	6.53E-04	4.32
MPP1	5.21	1.29E-05	6.53E-04	4.32
FCER1G	5.18	1.39E-05	6.62E-04	6.59
COX8A	5.16	1.49E-05	6.90E-04	4.25
OR5D14	-5.16	1.50E-05	6.90E-04	0.25
OAZ1	5.15	1.52E-05	6.96E-04	4.87
FTL	5.14	1.57E-05	7.09E-04	7.84
CSF1R	5.13	1.61E-05	7.21E-04	4.45
HLA-E	5.12	1.69E-05	7.41E-04	5.85
NDUFA1	5.11	1.72E-05	7.53E-04	4.74
HSP90AB1	5.08	1.88E-05	7.96E-04	7.90
GPX4	5.07	1.92E-05	8.10E-04	6.73
TLN1	5.06	1.95E-05	8.15E-04	4.37
RPL8	5.05	2.01E-05	8.24E-04	4.08
RPS8	5.04	2.11E-05	8.37E-04	4.38
ANP32B	5.04	2.11E-05	8.37E-04	5.41
PEA15	5.00	2.34E-05	8.77E-04	5.16
PP1B	4.98	2.46E-05	9.00E-04	8.40
SH3BGRL	4.98	2.47E-05	9.00E-04	4.24
GRN	4.97	2.53E-05	9.07E-04	7.24
HNRNPA2B1	4.96	2.58E-05	9.14E-04	6.34
NCF2	4.96	2.59E-05	9.14E-04	4.82
ATP5E	4.96	2.62E-05	9.21E-04	4.38
PLIN2	4.95	2.67E-05	9.31E-04	5.82
MDH1	4.95	2.72E-05	9.40E-04	5.79
IGBP1	4.94	2.75E-05	9.45E-04	6.14
NOP10	4.94	2.77E-05	9.47E-04	5.45
RAB10	4.92	2.95E-05	9.67E-04	5.12
BPTF	4.91	3.05E-05	9.74E-04	4.83
UTP3	4.90	3.07E-05	9.76E-04	4.21
PKM	4.89	3.17E-05	9.83E-04	4.44
ASAP1	4.89	3.19E-05	9.85E-04	4.54
RPS3	4.88	3.24E-05	9.91E-04	8.35
TMEM123	4.87	3.34E-05	1.01E-03	5.04
HCK	4.87	3.38E-05	1.02E-03	6.51
RPL13	4.86	3.46E-05	1.02E-03	4.45
DYNLL1	4.85	3.56E-05	1.03E-03	4.22
RAD23A	4.84	3.69E-05	1.05E-03	5.31
LAPTM5	4.83	3.80E-05	1.07E-03	6.29
RASGEF1B	4.82	3.84E-05	1.08E-03	5.40
UBB	4.82	3.88E-05	1.09E-03	4.54
CD44	4.82	3.92E-05	1.09E-03	8.06
FYN	4.81	3.99E-05	1.10E-03	4.32
RGCC	4.80	4.05E-05	1.11E-03	4.59
LIPA	4.80	4.15E-05	1.13E-03	4.12
ARF1	4.79	4.26E-05	1.15E-03	4.76
GNG10	4.75	4.72E-05	1.19E-03	4.56
EPB41L3	4.73	5.01E-05	1.22E-03	7.67
EEF1G	4.72	5.17E-05	1.23E-03	4.71
ATP6AP2	4.71	5.36E-05	1.25E-03	4.46
TMBIM6	4.69	5.55E-05	1.27E-03	5.64
HLA-C	4.67	5.87E-05	1.31E-03	4.44
ATP5I	4.67	5.99E-05	1.33E-03	5.05
TNS3	4.65	6.22E-05	1.35E-03	4.47
HNRNPL	4.64	6.37E-05	1.37E-03	4.57
ATF4	4.63	6.56E-05	1.38E-03	4.01
PRKCD	4.61	6.95E-05	1.42E-03	4.07
RPL27	4.59	7.38E-05	1.44E-03	4.31
ZFAND6	4.59	7.38E-05	1.44E-03	4.18
AURKAIP1	4.59	7.51E-05	1.46E-03	4.68
P4HB	4.58	7.59E-05	1.46E-03	6.82
PUF60	4.58	7.58E-05	1.46E-03	4.44
FLNA	4.56	8.03E-05	1.51E-03	4.16
HLA-DQA1	4.52	8.98E-05	1.58E-03	5.18
BNIP3L	4.51	9.16E-05	1.59E-03	5.24
LYZ	4.48	1.00E-04	1.66E-03	6.91

CLIC1	4.48	1.02E-04	1.67E-03	4.52
FUCA1	4.47	1.05E-04	1.68E-03	5.75
COX7C	4.45	1.09E-04	1.71E-03	5.36
HBB	-4.41	1.23E-04	1.83E-03	0.24
OS9	4.41	1.24E-04	1.83E-03	4.52
SNHG12	4.39	1.29E-04	1.87E-03	5.66
RPL14	4.38	1.35E-04	1.91E-03	4.51
ARHGDI1A	4.37	1.38E-04	1.93E-03	5.11
FCGR2A	4.37	1.39E-04	1.93E-03	4.13
LYN	4.36	1.39E-04	1.93E-03	4.32
MYH9	4.36	1.39E-04	1.93E-03	4.18
IL18BP	4.36	1.42E-04	1.95E-03	4.84
PSMG2	4.36	1.43E-04	1.95E-03	4.63
CCNH	4.34	1.48E-04	1.98E-03	5.05
CTSS	4.34	1.48E-04	1.99E-03	5.19
LGALS8	4.34	1.49E-04	1.99E-03	4.15
MYO1F	4.33	1.55E-04	2.02E-03	4.69
LDHA	4.33	1.55E-04	2.02E-03	4.35
PSTPIP2	4.31	1.61E-04	2.06E-03	4.07
OR4A15	-4.31	1.62E-04	2.07E-03	0.20
SQRDL	4.29	1.70E-04	2.12E-03	4.13
EEF2	4.26	1.86E-04	2.21E-03	4.23
HEXB	4.24	1.96E-04	2.26E-03	4.05
DAD1	4.21	2.15E-04	2.36E-03	4.03
TCIRG1	4.18	2.35E-04	2.47E-03	4.68
DDX39B	4.18	2.35E-04	2.47E-03	4.32
MREG	4.15	2.54E-04	2.59E-03	4.70
C15orf48	4.14	2.59E-04	2.61E-03	6.00
GDI1	4.07	3.18E-04	2.88E-03	4.35
APL2	4.06	3.28E-04	2.93E-03	4.59
CLPTM1L	4.04	3.40E-04	2.98E-03	5.46
FCN1	4.04	3.42E-04	2.98E-03	4.08
OLR1	4.03	3.57E-04	3.04E-03	4.52
PIK3R5	4.02	3.62E-04	3.06E-03	4.38
RHOQ	4.02	3.65E-04	3.08E-03	4.44
SLC26A11	3.99	3.96E-04	3.22E-03	5.25
ATF5	3.98	4.02E-04	3.24E-03	4.96
SRC	3.98	4.02E-04	3.24E-03	4.66
IL4I1	3.98	4.05E-04	3.25E-03	4.74
NFE2L2	3.91	4.93E-04	3.63E-03	4.29
HK2	3.88	5.26E-04	3.76E-03	5.02
NDRG1	3.85	5.73E-04	3.93E-03	5.27
RBM6	3.83	6.08E-04	4.04E-03	4.04
C3	3.83	6.11E-04	4.05E-03	5.20
OR5V1	-3.81	6.42E-04	4.17E-03	0.25
DDX24	3.80	6.65E-04	4.26E-03	4.03
CFHR4	-3.79	6.85E-04	4.33E-03	0.18
UBR4	3.78	6.88E-04	4.34E-03	4.32
OR8G1	-3.77	7.22E-04	4.45E-03	0.11
OR4K1	-3.74	7.83E-04	4.68E-03	0.22
ARAP1	3.72	8.09E-04	4.76E-03	5.18
MALAT1	3.69	8.98E-04	5.06E-03	4.59
NBPF10	3.66	9.61E-04	5.26E-03	6.63
KDM6B	3.64	0.0010221	5.46E-03	4.09
OR11H1	-3.55	0.0012912	6.16E-03	0.21
IL1B	3.49	0.001525	6.77E-03	5.26
LOC440040	-3.44	0.0017285	7.32E-03	0.24
ANPEP	3.43	0.0017778	7.44E-03	4.00
BANP	3.30	0.002482	9.15E-03	6.67
THBS1	3.29	0.0025571	9.32E-03	5.16
DRAM2	3.29	0.002573	9.33E-03	4.31
MAGEF1	-3.26	0.0027632	9.78E-03	0.24
SSX2	-3.25	0.0028169	9.90E-03	0.22

9.2 Anexo 2

Priorización de genes diferencialmente expresados (p-valor corregido por el método del FDR < 0.01, fold change absoluto ≥4; N=139) en monocitos tras el tratamiento con LPS.

Gen	Estadístico	p-valor	p-valor corregido por FDR	Fold Change
CCL3L1	7.19	5.30E-08	5.32E-04	14.22
CTSL	7.23	4.76E-08	5.32E-04	5.72
CCL22	6.96	9.82E-08	5.62E-04	8.00
ADA	6.92	1.12E-07	5.62E-04	6.38
IL1B	6.63	2.42E-07	6.08E-04	29.27
ANXA2P2	6.74	1.80E-07	6.08E-04	20.53
CCL3	6.63	2.41E-07	6.08E-04	16.55
IDO1	6.58	2.77E-07	6.18E-04	19.08
TXN	6.38	4.90E-07	9.84E-04	11.91
SERPINB2	6.27	6.65E-07	1.21E-03	17.42
CXCL1	6.14	9.42E-07	1.30E-03	7.81
MSN	6.18	8.39E-07	1.30E-03	6.72
TFPI2	6.13	9.67E-07	1.30E-03	6.36
PTGS2	6.04	1.25E-06	1.58E-03	11.77
CYBA	5.81	2.39E-06	2.42E-03	6.58
CCL4	5.81	2.41E-06	2.42E-03	6.43
IL36G	5.82	2.33E-06	2.42E-03	5.69
IL12B	5.74	2.92E-06	2.79E-03	9.76
TUBA1C	5.67	3.54E-06	2.96E-03	5.77
ANXA2	5.68	3.39E-06	2.96E-03	4.75
CREG1	5.68	3.43E-06	2.96E-03	4.43
CSTB	5.61	4.19E-06	3.12E-03	26.13
ACTG1	5.59	4.41E-06	3.14E-03	5.31
CTSH	5.55	4.95E-06	3.19E-03	4.08
ANXA5	5.49	5.89E-06	3.20E-03	6.48
CTSB	5.40	7.50E-06	3.20E-03	8.81
LAMP3	5.47	6.14E-06	3.20E-03	7.48
SOD2	5.40	7.47E-06	3.20E-03	5.86
AQP9	5.37	8.19E-06	3.20E-03	5.17
CXCL3	5.36	8.48E-06	3.20E-03	5.07
UFC1	5.39	7.85E-06	3.20E-03	5.05
RAP1B	5.41	7.40E-06	3.20E-03	5.02
ILK	5.44	6.72E-06	3.20E-03	4.31
TUBA1A	5.34	8.83E-06	3.22E-03	4.44
LCP1	5.32	9.54E-06	3.26E-03	5.67
PILRA	5.32	9.42E-06	3.26E-03	4.12
IL2RG	5.28	1.06E-05	3.32E-03	5.53
EDARADD	5.25	1.16E-05	3.33E-03	15.87
IER3	5.26	1.13E-05	3.33E-03	14.21
ACTR3	5.23	1.21E-05	3.34E-03	7.43
KIAA0391	5.22	1.24E-05	3.36E-03	5.17
IL1A	5.20	1.32E-05	3.44E-03	8.01
OGFRL1	5.20	1.34E-05	3.45E-03	4.55
C15orf48	5.19	1.38E-05	3.46E-03	11.02
CD83	5.19	1.37E-05	3.46E-03	5.29
CXCL2	5.16	1.50E-05	3.62E-03	9.13
RAC2	5.15	1.54E-05	3.62E-03	4.97
SQSTM1	5.15	1.53E-05	3.62E-03	4.33
EMP3	5.12	1.66E-05	3.62E-03	4.30
CAPG	5.11	1.72E-05	3.70E-03	4.31
TMEM123	5.09	1.79E-05	3.81E-03	6.09
ATP6VOE1	5.04	2.11E-05	3.83E-03	7.42
SQRDL	5.04	2.08E-05	3.83E-03	5.94
DNAJC7	5.04	2.09E-05	3.83E-03	5.23
IRAK2	5.07	1.89E-05	3.83E-03	4.64
SEC61B	5.07	1.91E-05	3.83E-03	4.19
IL2RA	5.04	2.09E-05	3.83E-03	4.17
UXT	5.03	2.13E-05	3.83E-03	4.10
TP11	5.01	2.28E-05	3.91E-03	5.52
PFN1	4.98	2.45E-05	4.09E-03	7.17
SERPINA1	4.97	2.57E-05	4.15E-03	4.60
MMADHC	4.96	2.60E-05	4.15E-03	4.36
DUSP5	4.93	2.82E-05	4.36E-03	6.91
INHBA	4.90	3.12E-05	4.62E-03	8.12
RAB10	4.91	3.05E-05	4.62E-03	5.71
CKB	4.87	3.36E-05	4.72E-03	4.27
ITGA1	4.87	3.41E-05	4.76E-03	4.34
PRDX1	4.86	3.45E-05	4.78E-03	9.03
ALDOA	4.85	3.55E-05	4.89E-03	6.11
CCL20	4.82	3.87E-05	4.94E-03	6.75
CYP1B1	4.82	3.91E-05	4.94E-03	5.20
RAD51L3-RFFL	4.83	3.81E-05	4.94E-03	4.41
SGPP2	4.82	3.93E-05	4.94E-03	4.79
CD44	4.80	4.10E-05	4.95E-03	9.24
FCER1G	4.80	4.12E-05	4.95E-03	6.46
PKM	4.76	4.54E-05	5.12E-03	4.72
SERPINB9	4.74	4.88E-05	5.30E-03	4.21
CTBP1	4.73	5.03E-05	5.32E-03	5.65
ASAP1	4.73	5.05E-05	5.32E-03	4.77
NPTN	4.71	5.34E-05	5.47E-03	4.20
ACTB	4.65	6.22E-05	5.94E-03	4.88
ENO1	4.63	6.59E-05	6.02E-03	5.22
PARK7	4.63	6.71E-05	6.02E-03	4.53
HCK	4.62	6.81E-05	6.04E-03	6.69
HNRNPA2B1	4.62	6.78E-05	6.04E-03	6.28
MARCKS	4.61	6.95E-05	6.07E-03	6.18
ILIRN	4.60	7.18E-05	6.12E-03	6.55
LYN	4.61	7.05E-05	6.12E-03	5.21
FCGR2A	4.60	7.17E-05	6.12E-03	4.94
PIK3AP1	4.58	7.72E-05	6.17E-03	4.81
ID2	4.57	7.73E-05	6.17E-03	4.75
EIF4G2	4.59	7.43E-05	6.17E-03	4.32
SERPINB6	4.58	7.64E-05	6.17E-03	4.08
PABPC1	4.58	7.66E-05	6.17E-03	4.01
H2AFY	4.56	7.95E-05	6.22E-03	6.28
ATP6VOB	4.56	8.07E-05	6.23E-03	5.76
PLA2G7	4.53	8.75E-05	6.50E-03	5.16
HBB	-4.52	8.93E-05	6.57E-03	0.21
LDHA	4.52	9.02E-05	6.58E-03	5.17
INSIG1	4.49	9.91E-05	6.87E-03	4.41
BIRC3	4.49	9.89E-05	6.87E-03	4.28
VIM	4.47	1.03E-04	6.87E-03	9.05
MYH9	4.47	1.03E-04	6.87E-03	4.79
CD58	4.47	1.03E-04	6.87E-03	4.35
EPB41L3	4.46	1.07E-04	6.99E-03	7.80
ARL8B	4.43	1.15E-04	7.37E-03	4.26
ATP13A3	4.43	1.16E-04	7.39E-03	8.41
PSAP	4.42	1.19E-04	7.50E-03	6.45
UQCRI0	4.42	1.20E-04	7.51E-03	4.28
SPPL2A	4.42	1.21E-04	7.54E-03	4.84
SH3BP5	4.40	1.25E-04	7.59E-03	5.22
HLA-E	4.40	1.25E-04	7.59E-03	5.08
CLDND1	4.41	1.23E-04	7.59E-03	4.08
SERPINB1	4.39	1.29E-04	7.60E-03	4.50
KDM6B	4.39	1.31E-04	7.65E-03	6.14
NOP10	4.37	1.37E-04	7.75E-03	4.98
MAP3K8	4.36	1.40E-04	7.82E-03	4.62
LGALS8	4.36	1.42E-04	7.82E-03	4.60
FNBP1	4.35	1.44E-04	7.82E-03	4.16
GCH1	4.36	1.40E-04	7.82E-03	4.16
BNIP3L	4.34	1.47E-04	7.96E-03	5.50
SRC	4.33	1.54E-04	8.22E-03	5.99
HLA-C	4.32	1.56E-04	8.27E-03	4.37
THBS1	4.32	1.58E-04	8.28E-03	9.98
CHST2	4.32	1.58E-04	8.28E-03	4.67
TRAF1	4.29	1.69E-04	8.55E-03	5.66
DDX60L	4.27	1.80E-04	8.81E-03	4.67
IFI30	4.26	1.88E-04	9.00E-03	4.62
SLC43A3	4.26	1.89E-04	9.00E-03	4.59
CFLAR	4.26	1.88E-04	9.00E-03	4.35
FLNA	4.25	1.94E-04	9.12E-03	4.13
C3	4.22	2.11E-04	9.30E-03	6.96
LGALS3	4.22	2.11E-04	9.30E-03	5.56
ADAR	4.19	2.24E-04	9.43E-03	4.00
GOLGA6D	-4.16	2.43E-04	9.62E-03	0.25
ANPEP	4.16	2.48E-04	9.68E-03	6.03
CXCL8	4.16	2.49E-04	9.71E-03	7.06
RNASEK	4.14	2.58E-04	9.87E-03	4.73
GPX4	4.14	2.61E-04	9.95E-03	5.28

9.3 Anexo 3

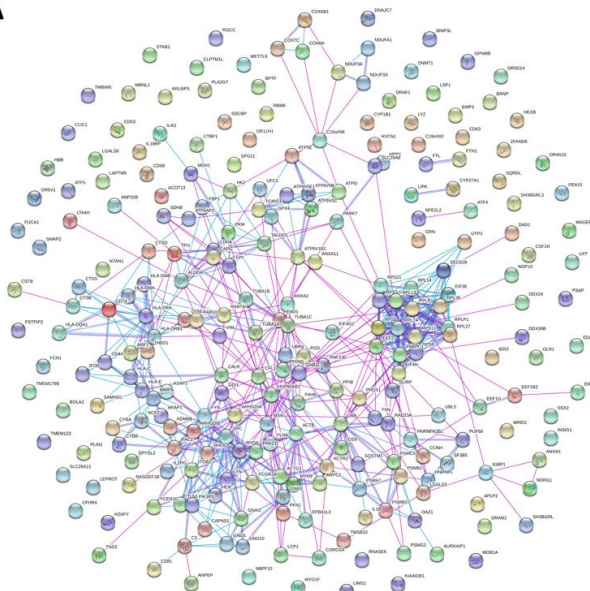
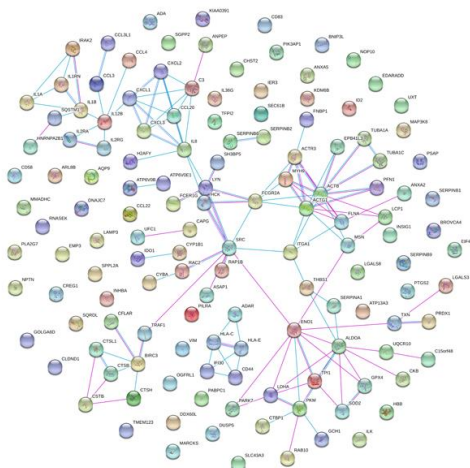
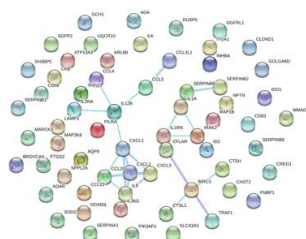
Priorización de genes diferencialmente expresados (p-valor corregido por el método del FDR < 0.01, *fold change* absoluto ≥4; N=64) en monocitos exclusivamente tras el tratamiento con LPS

Gen	Estadístico	p-valor	p-valor corregido por FDR	Fold Change
ADA	6.92	1.12E-07	5.62E-04	6.38
ADAR	4.19	2.24E-04	9.43E-03	4.00
AQP9	5.37	8.19E-06	3.20E-03	5.17
ARL8B	4.43	1.15E-04	7.37E-03	4.26
ATP13A3	4.43	1.16E-04	7.39E-03	8.41
BIRC3	4.49	9.89E-05	6.87E-03	4.28
CCL20	4.82	3.87E-05	4.94E-03	6.75
CCL22	6.96	9.82E-08	5.62E-04	8.00
CCL3	6.63	2.41E-07	6.08E-04	16.55
CCL3L1	7.19	5.30E-08	5.32E-04	14.22
CCL4	5.81	2.41E-06	2.42E-03	6.43
CD58	4.47	1.03E-04	6.87E-03	4.35
CD83	5.19	1.37E-05	3.46E-03	5.29
CFLAR	4.26	1.88E-04	9.00E-03	4.35
CHST2	4.32	1.58E-04	8.28E-03	4.67
CKB	4.87	3.36E-05	4.72E-03	4.27
CLDND1	4.41	1.23E-04	7.59E-03	4.08
CREG1	5.68	3.43E-06	2.96E-03	4.43
CTSH	5.55	4.95E-06	3.19E-03	4.08
CTSL	7.23	4.76E-08	5.32E-04	5.72
CXCL1	6.14	9.42E-07	1.30E-03	7.81
CXCL2	5.16	1.50E-05	3.62E-03	9.13
CXCL3	5.36	8.48E-06	3.20E-03	5.07
CXCL8	4.16	2.49E-04	9.71E-03	7.06
DDX60L	4.27	1.80E-04	8.81E-03	4.67
DUSP5	4.93	2.82E-05	4.36E-03	6.91
FNBP1	4.35	1.44E-04	7.82E-03	4.16
GCH1	4.36	1.40E-04	7.82E-03	4.16
GOLGA6D	-4.16	2.43E-04	9.62E-03	0.25
ID2	4.57	7.73E-05	6.17E-03	4.75
IDO1	6.58	2.77E-07	6.18E-04	19.08
IL12B	5.74	2.92E-06	2.79E-03	9.76

IL1A	5.20	1.32E-05	3.44E-03	8.01
IL1RN	4.60	7.18E-05	6.12E-03	6.55
IL2RA	5.04	2.09E-05	3.83E-03	4.17
IL36G	5.82	2.33E-06	2.42E-03	5.69
ILK	5.44	6.72E-06	3.20E-03	4.31
INHBA	4.90	3.12E-05	4.62E-03	8.12
IRAK2	5.07	1.89E-05	3.83E-03	4.64
ITGA1	4.87	3.41E-05	4.76E-03	4.34
LAMP3	5.47	6.14E-06	3.20E-03	7.48
MAP3K8	4.36	1.40E-04	7.82E-03	4.62
MARCKS	4.61	6.95E-05	6.07E-03	6.18
MMADHC	4.96	2.60E-05	4.15E-03	4.36
NPTN	4.71	5.34E-05	5.47E-03	4.20
OGFRL1	5.20	1.34E-05	3.45E-03	4.55
PIK3AP1	4.58	7.72E-05	6.17E-03	4.81
PILRA	5.32	9.42E-06	3.26E-03	4.12
PTGS2	6.04	1.25E-06	1.58E-03	11.77
RAD51L3-RFFL	4.83	3.81E-05	4.94E-03	4.41
RAP1B	5.41	7.40E-06	3.20E-03	5.02
SERPINA1	4.97	2.57E-05	4.15E-03	4.60
SERPINB1	4.39	1.29E-04	7.60E-03	4.50
SERPINB2	6.27	6.65E-07	1.21E-03	17.42
SERPINB6	4.58	7.64E-05	6.17E-03	4.08
SERPINB9	4.74	4.88E-05	5.30E-03	4.21
SGPP2	4.82	3.93E-05	4.94E-03	4.79
SH3BP5	4.40	1.25E-04	7.59E-03	5.22
SLC43A3	4.26	1.89E-04	9.00E-03	4.59
SOD2	5.40	7.47E-06	3.20E-03	5.86
SPPL2A	4.42	1.21E-04	7.54E-03	4.84
TFPI2	6.13	9.67E-07	1.30E-03	6.36
TRAF1	4.29	1.69E-04	8.55E-03	5.66
UQCRI0	4.42	1.20E-04	7.51E-03	4.28

9.4 Anexo 4

Redes de interacción proteína-proteína construidas a partir de los genes diferencialmente expresados en condiciones basales (A), tras la estimulación con LPS (B) y los genes exclusivos de la activación con LPS (C).

A**B****C**

9.5 Anexo 5

Módulos funcionales enriquecidos (valor de enriquecimiento superior a 2 y tres o más procesos biológicos con un p-valor corregido por el método del FDR inferior a 0.05) identificados mediante DAVID para los genes diferencialmente expresados en condiciones basales. Se indican los tres procesos biológicos más significativos de cada módulo.

Clusters and terms	Count	FE	FDR
Annotation Cluster 1; No. GO terms: 10; Enrichment score: 11.3			
Antigen processing and presentation of peptide antigen (GO:0048002)	27	9.8	5.97E-15
Antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen (GO:0002478)	26	10.4	6.12E-15
Antigen processing and presentation of exogenous antigen (GO:0019884)	26	10.0	1.74E-14
Annotation Cluster 2; No. GO terms: 6; Enrichment score: 11.2			
Interspecies interaction between organisms (GO:0044419)	51	3.3	1.50E-10
Symbiosis, encompassing mutualism through parasitism (GO:0044403)	51	3.3	1.50E-10
Viral process (GO:0016032)	50	3.4	1.77E-10
Annotation Cluster 3; No. GO terms: 4; Enrichment score: 7.3			
Peptide antigen assembly with MHC protein complex (GO:0002501)	6	64.8	9.19E-06
MHC protein complex assembly (GO:0002396)	6	55.6	3.18E-05
MHC class II protein complex assembly (GO:0002399)	5	64.8	5.06E-04
Annotation Cluster 4; No. GO terms: 10; Enrichment score: 6.8			
Cellular response to chemical stimulus (GO:0070887)	89	2.2	4.05E-10
Response to chemical (GO:0042221)	116	1.8	2.13E-09
Signal transduction (GO:0007165)	133	1.5	3.44E-05
Annotation Cluster 5; No. GO terms: 36			
Single-organism transport (GO:0044765)	101	1.9	1.13E-08
Single-organism localization (GO:1902578)	104	1.9	2.38E-08
Localization (GO:0051179)	141	1.6	2.54E-07
Annotation Cluster 6; No. GO terms: Enrichment score: 6.8			
Immune system process (GO:0002376)	80	2.1	7.77E-08
Immune response-activating cell surface receptor signaling pathway (GO:0002429)	27	4.8	1.78E-07
Activation of immune response (GO:0002253)	33	3.9	1.83E-07
Annotation Cluster 7; No. GO terms: 8; Enrichment score: 5.5			
Platelet activation (GO:0030168)	16	6.4	5.27E-05
Cell activation (GO:0001775)	36	2.6	9.65E-04
Hemostasis (GO:0007599)	21	3.8	1.36E-03
Annotation Cluster 8; No. GO terms: 21; Enrichment score: 4.7			
Protein localization to endoplasmic reticulum (GO:0070972)	15	7.6	1.98E-05
Establishment of protein localization to endoplasmic reticulum (GO:0072599)	14	8.4	2.08E-05
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane (GO:0006614)	13	8.8	5.02E-05
Annotation Cluster 9; No. GO terms: 35; Enrichment score: 4.6			
Purine nucleoside triphosphate metabolic process (GO:0009144)	22	5.2	3.02E-06
Purine ribonucleoside triphosphate metabolic process (GO:0009205)	21	5.1	1.11E-05
Nucleoside triphosphate metabolic process (GO:0009141)	22	4.8	1.28E-05
Annotation Cluster 10; No. GO terms: 7; Enrichment score: 4.5			
Cellular response to organic substance (GO:0071310)	73	2.2	2.37E-07
Response to organic substance (GO:0010033)	85	2.0	6.44E-07
Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway (GO:0007169)	28	2.8	4.97E-03
Annotation Cluster 11; No. GO terms: 9; Enrichment score: 4.3			
Cell death (GO:0008219)	63	2.09	3.20E-05
Negative regulation of cell death (GO:0060548)	37	2.67	2.31E-04
Regulation of cell death (GO:0010941)	50	2.15	6.95E-04
Annotation Cluster 12; No. GO terms:24; Enrichment score: 4.2			
Cell-cell adhesion (GO:0098609)	55	3.06	2.89E-10
Biological adhesion (GO:0022610)	66	2.51	4.90E-09
Cell adhesion (GO:0007155)	65	2.48	1.29E-08
Annotation Cluster 13; No. GO terms:12; Enrichment score: 3.7			
Actin cytoskeleton organization (GO:0030036)	30	3.52	1.58E-05
Regulation of cellular component organization (GO:0051128)	71	1.98	2.17E-05
Positive regulation of cellular component organization (GO:0051130)	45	2.47	7.02E-05
Annotation Cluster 14; No. GO terms:7; Enrichment score: 3.4			
Response to reactive oxygen species (GO:0000302)	17	5.25	3.05E-04
Response to hydrogen peroxide (GO:0042542)	13	6.74	9.56E-04
Response to inorganic substance (GO:0010035)	24	3.32	1.92E-03
Annotation Cluster 15; No. GO terms:10; Enrichment score: 3.1			
Positive regulation of response to stimulus (GO:0048584)	68	2.17	1.21E-06
Regulation of response to stimulus (GO:0048583)	94	1.68	1.33E-04
Positive regulation of protein metabolic process (GO:0051247)	51	2.19	2.71E-04
Annotation Cluster 16; No. GO terms:6; Enrichment score: 3.0			
Regulation of protein localization (GO:0032880)	36	2.43	3.46E-03
Positive regulation of transport (GO:0051050)	35	2.47	3.46E-03
Regulation of establishment of protein localization (GO:0070201)	32	2.53	6.49E-03
Annotation Cluster 17; No. GO terms:26; Enrichment score: 2.9			
Immune response-activating cell surface receptor signaling pathway (GO:0002429)	27	4.77	1.78E-07
Activation of immune response (GO:0002253)	33	3.89	1.83E-07
Immune response-activating signal transduction (GO:0002757)	31	4.04	3.21E-07
Annotation Cluster 18; No. GO terms:4; Enrichment score: 2.3			
Proton transport (GO:0015992)	13	5.51	8.19E-03
Hydrogen transport (GO:0006818)	13	5.44	9.37E-03
Hydrogen ion transmembrane transport (GO:1902600)	11	6.31	1.80E-02
Annotation Cluster 19; No. GO terms:5; Enrichment score: 2.2			
Regulation of protein localization (GO:0032880)	36	2.43	3.46E-03
Regulation of establishment of protein localization (GO:0070201)	32	2.53	6.49E-03
Regulation of intracellular transport (GO:0032386)	23	3.16	7.62E-03

Cluster: módulo funcional; No. GO terms: número de procesos biológicos incluidos en cada módulo; Count: número de genes de la lista incluidos en cada proceso biológico; FE: valor de enriquecimiento; FDR: *false discovery rate*

9.6 Anexo 6

Módulos funcionales enriquecidos (valor de enriquecimiento superior a 2 y tres o más procesos biológicos con un p-valor corregido por el método del FDR inferior a 0.05) identificados mediante DAVID para los genes diferencialmente expresados tras el tratamiento de los monocitos con LPS. Se indican los tres procesos biológicos más significativos de cada módulo.

Clusters and terms	Count	FE	FDR
Annotation Cluster 1; No. GO terms: 31; Enrichment score: 10,5			
Response to stress (GO:0006950)	79	2.69	5.67E-17
Immune system process (GO:0002376)	64	3.25	3.56E-16
Immune response (GO:0006955)	51	4.12	8.50E-16
Annotation Cluster 2; No. GO terms: 11; Enrichment score: 9.7			
Defense response (GO:0006952)	49	4.05	1.25E-14
Regulation of response to stress (GO:0080134)	37	3.61	2.17E-08
Innate immune response (GO:0045087)	28	4.20	6.32E-07
Annotation Cluster 3; No. GO terms: 38; Enrichment score: 8.0			
Leukocyte migration (GO:0050900)	25	8.33	4.14E-12
Inflammatory response (GO:0006954)	30	5.90	2.48E-11
Granulocyte migration (GO:0097530)	16	17.59	2.71E-11
Annotation Cluster 4; No. GO terms: 9; Enrichment score: 7.4			
Cell death (GO:0008219)	46	2.94	2.38E-08
Regulation of cell death (GO:0010941)	38	3.16	4.89E-07
Regulation of apoptotic process (GO:0042981)	35	3.13	4.11E-06
Annotation Cluster 5; No. GO terms: 14; Enrichment score: 7.2			
Defense response (GO:0006952)	49	4.05	1.25E-14
Inflammatory response (GO:0006954)	30	5.90	2.48E-11
Response to external biotic stimulus (GO:0043207)	28	4.23	5.25E-07
Annotation Cluster 6; No. GO terms: 7; Enrichment score: 6.3			
Wound healing (GO:0042060)	21	4.86	1.83E-05
Response to wounding (GO:0009611)	22	4.25	7.32E-05
Blood coagulation (GO:0007596)	16	5.86	1.63E-04
Annotation Cluster 7; No. GO terms: 10; Enrichment score: 5.8			
Positive regulation of immune system process (GO:0002684)	37	4.83	3.72E-12
Positive regulation of defense response (GO:0031349)	20	6.23	7.70E-07
Regulation of defense response (GO:0031347)	25	4.63	1.08E-06
Annotation Cluster 8; No. GO terms: 44; Enrichment score: 5.2			
Positive regulation of response to stimulus (GO:0048584)	50	3.09	2.86E-10
Regulation of response to stimulus (GO:0048583)	65	2.24	2.09E-08
Regulation of catalytic activity (GO:0050790)	50	2.66	7.51E-08
Annotation Cluster 9; No. GO terms: 3; Enrichment score: 4.9			
Cell proliferation (GO:0008283)	36	2.42	0.00138
Negative regulation of cell proliferation (GO:0008285)	20	3.85	0.001671
Regulation of cell proliferation (GO:0042127)	32	2.58	0.002003
Annotation Cluster 10; No. GO terms: 11; Enrichment score: 7.8			
Negative regulation of endopeptidase activity (GO:0010951)	14	7.47	8.55E-05
Negative regulation of peptidase activity (GO:0010466)	14	7.10	1.53E-04
Negative regulation of molecular function (GO:0044092)	28	3.19	2.14E-04
Annotation Cluster 11; No. GO terms: 13; Enrichment score: 4.2			
Response to interferon-gamma (GO:0034341)	13	10.12	1.05E-05
Cellular response to interferon-gamma (GO:0071346)	12	11.14	1.84E-05
Response to interleukin-1 (GO:0070555)	11	12.09	4.36E-05
Annotation Cluster 12; No. GO terms: 9; Enrichment score: 3.6			
Regulation of immune response (GO:0050776)	28	3.85	4.23E-06
Positive regulation of immune response (GO:0050778)	21	3.85	8.11E-04
Phagocytosis (GO:0006909)	13	5.88	3.89E-03
Annotation Cluster 13; No. GO terms: 16; Enrichment score: 3.5			
Interspecies interaction between organisms (GO:0044419)	26	3.26	4.68E-04
Symbiosis, encompassing mutualism through parasitism (GO:0044403)	26	3.26	4.68E-04
Regulation of multi-organism process (GO:0043900)	15	4.99	3.30E-03
Annotation Cluster 14; No. GO terms: 6; Enrichment score: 3.2			
Response to reactive oxygen species (GO:0000302)	13	7.76	2.03E-04
Response to toxic substance (GO:0009636)	12	7.44	1.14E-03
Response to hydrogen peroxide (GO:0042542)	10	10.03	1.23E-03
Annotation Cluster 15; No. GO terms: 20; Enrichment score: 3.0			
Positive regulation of protein phosphorylation (GO:0001934)	26	3.66	5.19E-05
Positive regulation of phosphorylation (GO:0042327)	26	3.50	1.27E-04
Positive regulation of MAPK cascade (GO:0043410)	18	4.65	5.37E-04
Annotation Cluster 16; No. GO terms: 5; Enrichment score: 3.1			
Cell-cell adhesión (GO:0098609)	38	4.09	2.29E-10
Cell adhesión (GO:0007155)	42	3.10	6.09E-08
Biological adhesión (GO:0022610)	42	3.09	6.80E-08
Annotation Cluster 17; No. GO terms: 3; Enrichment score: 2.9			
Regulation of reactive oxygen species metabolic process (GO:2000377)	10	8.19	6.63E-03
Reactive oxygen species biosynthetic process (GO:1903409)	8	11.79	9.18E-03
Reactive oxygen species metabolic process (GO:0072593)	11	6.21	2.03E-02
Annotation Cluster 18; No. GO terms: 3; Enrichment score: 2.6			
Positive regulation of cytokine production (GO:0001819)	18	5.84	1.98E-05
Regulation of cytokine production (GO:0001817)	20	4.34	2.66E-04
Cytokine production (GO:0001816)	20	3.97	1.05E-03

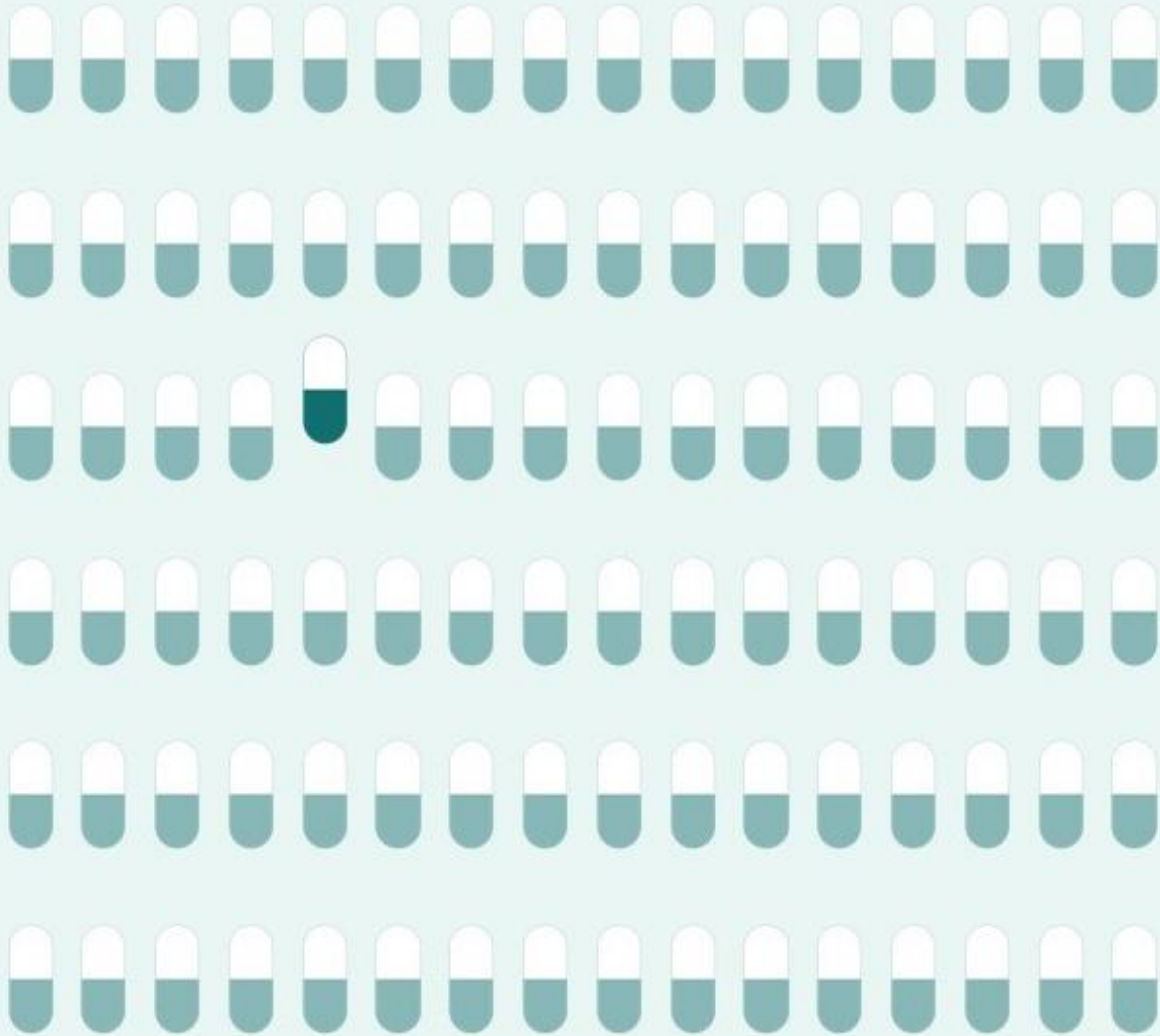
Cluster: módulo funcional; No. GO terms: número de procesos biológicos incluidos en cada módulo; Count: número de genes de la lista incluidos en cada proceso biológico; FE: valor de enriquecimiento; FDR: *false discovery rate*

9.7 Anexo 7

Módulos funcionales enriquecidos (valor de enriquecimiento superior a 2 y tres o más procesos biológicos con un p-valor corregido por el método del FDR inferior a 0.05) identificados mediante DAVID para los genes diferencialmente expresados exclusivamente tras el tratamiento con LPS. Se indican los tres procesos biológicos más significativos de cada módulo.

Clusters and terms	Count	FE	FDR
Annotation Cluster 1; No. GO terms: 27; Enrichment score: 7.7			
Defense response (GO:0006952)	29	5.44	1.63E-11
Response to cytokine (GO:0034097)	22	7.81	1.56E-10
Immune system process (GO:0002376)	34	3.93	1.84E-10
Annotation Cluster 2; No. GO terms: 26; Enrichment score: 6.6			
Defense response (GO:0006952)	29	5.44	1.63E-11
Response to cytokine (GO:0034097)	22	7.81	1.56E-10
Immune system process (GO:0002376)	34	3.93	1.84E-10
Annotation Cluster 3; No. GO terms: 3; Enrichment score: 6.5			
Regulation of response to external stimulus (GO:0032101)	15	5.92	1.98E-04
Regulation of defense response (GO:0031347)	14	5.89	6.80E-04
Regulation of response to stress (GO:0080134)	18	3.99	1.63E-03
Annotation Cluster 4; No. GO terms: 43; Enrichment score: 5.8			
Response to cytokine (GO:0034097)	22	7.81	1.56E-10
Inflammatory response (GO:0006954)	20	8.94	3.23E-10
Neutrophil migration (GO:1990266)	11	33.31	1.37E-09
Annotation Cluster 5; No. GO terms: 29; Enrichment score: 4.6			
Positive regulation of response to stimulus (GO:0048584)	27	3.79	9.50E-07
Positive regulation of intracellular signal transduction (GO:1902533)	19	5.91	1.53E-06
Regulation of catalytic activity (GO:0050790)	28	3.38	4.51E-06
Annotation Cluster 6; No. GO terms: 5; Enrichment score: 3.4			
Regulation of cellular protein metabolic process (GO:0032268)	26	3.15	1.08E-04
Regulation of protein metabolic process (GO:0051246)	26	2.95	4.18E-04
Regulation of hydrolase activity (GO:0051336)	17	3.62	0.014
Annotation Cluster 7; No. GO terms: 6; Enrichment score: 3.4			
Apoptotic process (GO:0006915)	21	3.42	1.31E-03
Programmed cell death (GO:0012501)	21	3.23	3.31E-03
Regulation of apoptotic process (GO:0042981)	18	3.66	5.31E-03

Cluster: módulo funcional; No. GO terms: número de procesos biológicos incluidos en cada módulo; Count: número de genes de la lista incluidos en cada proceso biológico; FE: valor de enriquecimiento; FDR: *false discovery rate*



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Departamento de Fundamentos Clínicos
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud