

S. Martínez-Barrondo¹
P. A. Saiz¹
B. Morales²
M. P. García-Portilla¹
E. Coto²
V. Álvarez²
J. Bobes¹

Polimorfismos serotoninérgicos en pacientes con trastorno de angustia

¹ Área de Psiquiatría
Departamento de Medicina
Universidad de Oviedo
² Laboratorio de Genética Molecular
Hospital Universitario Central de Asturias

Introducción. El objetivo es determinar la posible asociación entre cuatro polimorfismos de genes serotoninérgicos (T102C, A-1438G, 5-HTTLPR y VNTR-5HTT) y el trastorno de angustia (TA).

Pacientes y método. El estudio incluye 92 pacientes ambulatorios diagnosticados de TA (criterios DSM-IV) y 174 voluntarios sanos de Asturias (grupo control). Los polimorfismos se determinaron tras la amplificación de los genes mediante reacción en cadena de la polimerasa y su posterior digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa.

Resultados. Ambos polimorfismos 5-HT_{2A} (T102C y A-1438G) se encuentran en desequilibrio de ligamiento completo en nuestra población. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas de los polimorfismos genéticos serotoninérgicos estudiados (T102C, A-1438G, 5HTTLPR y VNTR-5HTT) entre el grupo de pacientes y el grupo control. Las frecuencias alélicas tampoco diferían entre ambos grupos. El análisis en función del sexo tampoco aportó diferencias estadísticamente significativas.

Conclusiones. Los polimorfismos estudiados no se asociaron con TA en nuestra población. No obstante, son necesarios estudios con mayor número de pacientes para poder confirmar o rechazar estos hallazgos.

Palabras clave:
Trastorno de angustia. Polimorfismos 5-HT_{2A}. Polimorfismos 5-HTT. Estudio de asociación.

Actas Esp Psiquiatr 2005;33(4):210-216

Serotonin gene polymorphisms in patients with panic disorder

Introduction. The objective is to investigate the possible association between four serotonin gene polymorphisms (T102C, A-1438G, 5-HTTLPR and VNTR-5HTT) and panic disorder (PD).

Correspondencia:
Sara Martínez Barrondo
Área de Psiquiatría. Facultad de Medicina
Julión Clavería, 6, 3.º
33006 Oviedo
Correo electrónico: s.barrondo@terra.es

Patients and method. 92 PD outpatients (DSM-IV criteria) and 174 healthy volunteers from Asturias (control group) were included. Polymorphisms were determined after polymerase chain reaction amplification followed by digestion with restriction enzymes and electrophoresis on an agarose gel.

Results. Both 5-HT_{2A} polymorphisms are in complete linkage disequilibrium in our population. No statistically significant differences in genotype frequencies of serotonin gene polymorphisms (T102C, A-1438G, 5HTTLPR and VNTR-5HTT) were found between patients and control subjects. Allele frequencies did not differ between both groups. No differences were found according to gender.

Conclusions. The polymorphisms studied were not associated with PD in our population. However, larger patient samples are necessary to confirm or reject these findings.

Key words:
Panic disorder. 5-HT_{2A} polymorphisms. 5-HTT polymorphisms. Association study.

INTRODUCCIÓN

Son muchos los trabajos que hasta la fecha estudian distintos polimorfismos genéticos en relación con trastornos mentales muy diversos¹⁻³. Evidencias actuales demuestran, sin lugar a dudas, el efecto terapéutico de los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (ISRS) en el tratamiento del trastorno de angustia (TA). La neurotransmisión serotoninérgica es un proceso complejo en el que se involucran distintos mecanismos pre y postsinápticos. Alteraciones de dicha neurotransmisión han sido descritas en distintos fenotipos psiquiátricos, como el suicidio, el comportamiento impulsivo violento, la narcolepsia o el alcoholismo⁴.

Existen evidencias de la presencia de una agregación familiar del TA, si bien ésta no se ha podido delimitar claramente debido a la escasez de estudios realizados hasta la fecha, así como por las diferencias metodológicas que existen entre ellos. Al menos existen seis estudios familiares que ponen de manifiesto que el riesgo de padecer un

trastorno mental entre familiares de pacientes con TA es 3,4-14,7 veces mayor que el riesgo en familiares de controles sanos⁵. Realizando la correspondiente corrección para el factor edad de los estudios con metodología más rigurosa⁶⁻¹¹, puede decirse que el riesgo de padecer TA entre familiares de primer grado de personas que padecen este trastorno es de, aproximadamente, el 14 %. Los estudios de gemelos son aún más escasos¹²⁻¹⁵, si bien evidencian la presencia de un componente genético en el TA. El estudio que utiliza una mayor muestra refiere tasas de concordancia monocigotos:digigotos (MZ:DZ) de 24:11, estimando una heredabilidad para este trastorno que oscilaría entre el 30-40 %¹⁶. Los estudios de ligamiento realizados en el TA a lo largo de los últimos años han asociado dicho trastorno con distintas localizaciones: en el cromosoma 16¹⁷, en el cromosoma 20¹⁸ y más recientemente, Gratacòs et al.¹⁹ han implicado al brazo largo del cromosoma 15, aunque estos datos no han sido confirmados por otros autores^{20,21}.

Como ya se ha comentado, las evidencias actuales apoyan el posible papel de las variaciones genéticas de la transmisión serotoninérgica en el TA. Concretamente, el transportador de la serotonina (5-HTT) es un punto clave de la actuación de los ISRS, y la activación postsináptica del receptor serotoninérgico 2A (5-HT_{2A}) puede desempeñar un papel relevante en la mejoría sintomática de dichos pacientes.

El receptor 5-HT_{2A} se cree que puede desempeñar un papel en el desarrollo y la diferenciación celular a la vez que es el lugar de acción de determinadas drogas y fármacos^{22,23}. El gen del receptor 5-HT_{2A} se localiza en el brazo largo del cromosoma 13. Existen descritos dos polimorfismos silentes en la región promotora de dicho gen (T102C y A-1438G) que están en desequilibrio de ligamiento²⁴. El polimorfismo genético T102C contiene tres variantes polimórficas (TT, TC y CC) al igual que el polimorfismo genético A-1438 (AA, AG y GG).

Por otro lado, el gen 5-HTT se localiza en el brazo largo del cromosoma 17. En dicho gen se han descrito dos variantes polimórficas de interés. En el extremo 5' de la región promotora se localiza un polimorfismo funcional que consiste en la inserción/deleción de 44 pares de bases (pb) (5-HTTLPR). En estudios *in vitro* se ponen de manifiesto las tres variantes polimórficas (SS, SL y LL) con diferencias en los niveles de transcripción²⁵. La transcripción del 5-HTT se ha demostrado²⁵ que está modulada por el polimorfismo genético 5-HTTLPR; también Lesch et al.²⁵ observan cómo el alelo más corto de dicho polimorfismo genético se asocia significativamente con rasgos de personalidad ansiosos en sujetos sanos, aunque no todos los estudios han sido capaces de replicarlo^{26,27}. La segunda variante polimórfica consiste en la presencia de un número variable de repeticiones (9, 10 ó 12 repeticiones) de 17 pb (VNTR) que se localiza en el intrón 2. Ensayos *in vitro* sugieren que las variantes cortas de este polimorfismo disminuyen la transcripción del gen 5-HTT y la concentración y funcionalidad de la proteína 5-HTT²⁸.

El objetivo de este estudio es aclarar la posible asociación entre los mencionados polimorfismos serotoninérgicos y el TA, analizando un grupo de pacientes con TA y un grupo control. También se investiga la posible relación de dichos polimorfismos y el sexo.

METODOLOGÍA

Pacientes y controles

El estudio incluye un total de 92 pacientes ambulatorios diagnosticados de TA (según criterios diagnósticos del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales en la versión IV [DSM-IV]) (grupo caso) y un grupo control constituido por 174 voluntarios sanos de características étnicas y sociodemográficas similares al grupo caso. Este estudio se ha llevado a cabo siguiendo la normativa de la Declaración de Helsinki²⁹ y todos los participantes incluidos fueron adecuadamente informados y dieron su consentimiento por escrito antes de la realización del estudio.

Método

Se obtuvo ADN genómico de todos los sujetos estudiados a partir de leucocitos polimorfonucleares de una muestra de 10 ml de sangre periférica utilizando etilendiaminetetracético (EDTA) como anticoagulante y siguiendo el método de Miller y Polesky³⁰.

La determinación de los genotipos para los distintos polimorfismos genéticos fue llevada a cabo por amplificación, mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR), de los fragmentos de ADN que contienen células polimórficas. Dicha amplificación se realizó a 32 ciclos de desnaturalización (98° -30 s) utilizando cebadores, temperaturas de cebamiento y tiempos concretos para cada polimorfismo genético (tabla 1). Posteriormente se realizó una extensión durante 1 min a 72°, finalizando el proceso con una nueva extensión de 5 min a 72°.

En aquellos polimorfismos genéticos que lo requerían se sometió el producto amplificado a una digestión con enzimas de restricción a las temperaturas de cebamiento correspondientes para cada uno (tabla 2).

Los productos obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio al 3 %, para la visualización con luz ultravioleta de los alelos (tabla 2).

Análisis estadístico

Las posibles diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo caso y el grupo control se evaluaron mediante el test de la χ^2 , utilizando la corrección de continuidad siempre que fue posible (grados de libertad = 1). De igual modo se calcularon las diferentes *odds ratio* (OR) y sus

Tabla 1	Parejas de cebadores, temperatura y tiempo de cebamiento para amplificar las secuencias 5-HT _{2A} y 5-HTT		
Polimorfismo genético	Cebadores (sentido/antisentido)	Temperatura de cebamiento	Tiempo de cebamiento
T102C	5'-TCTGCTACAAGTTCTGGCTT-3' 5'-CTGCAGCTTTTTCTCTAGGG-3'	62°	1 min
A-1438G	5'-GTGCTAATAGTTTATCAGAGTTATCACAC-3' 5'-TGGTAATTTTTAGGCTGAAGGGT-3'	62°	1 min
5-HTTLPR	5'-TTCACCCCTCGCGGCAT-3' 5'-GGGGATAATGGGGTTGCAGGG-3'	65°	1 min
VNTR-5HTT	5'-GTCAGTATCACTGGCTGCGTG-3' 5'-TCATGTTCTAGTCTTACGCCAGTG-3'	62°	1 min

correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95%. El nivel de significación seleccionado fue, en todos los casos, del 5%.

RESULTADOS

La muestra estaba compuesta por 92 pacientes ambulatorios diagnosticados de TA (criterios DSM-IV), con una edad media (desviación estándar, DE) de 35,87 (12,38) años, de los cuales un 30,4% (28 pacientes) eran varones. El grupo control estaba compuesto por 174 voluntarios sanos, con una edad media de años de 38,40 años (DE: 8,94), de los cuales el 38,5% (67 sujetos) eran varones.

Polimorfismos 5-HT_{2A}

En nuestra población, ambos polimorfismos 5-HT_{2A} se encuentran en desequilibrio de ligamiento completo. Es decir, los homocigotos 102TT eran homocigotos -1438AA y los homocigotos 102CC eran homocigotos -1438GG.

Tabla 2	Enzimas de restricción y tamaño de los alelos de los polimorfismos genéticos 5-HT _{2A} y 5-HTT	
Polimorfismo	Enzima de restricción (temperatura de cebamiento)	Tamaño de los alelos
T102C	MspI (37°)	T-342pb C-216 y 126 pb
A-1438G	MspI (37°)	A-200 pb G-140 y 60 pb
VNTR-5HTT	TaqI (65°)	Alelo 9 rep - 345 pb Alelo 10 rep - 360 pb Alelo 12 rep - 390 pb
5-HTTLPR	-	Alelo L - 528 pb Alelo S - 484 pb

No observamos diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de los genotipos del polimorfismo T102C, ni del A-1438G entre los pacientes con TA y el grupo control ($p = 0,472$) (tablas 3 y 4). Las frecuencias alélicas para T102 y C102 (o A-1438 y G-1438) también fueron similares en ambos grupos ($p = 0,705$; OR: 0,92; IC 95%: 0,64-1,31) (tablas 3 y 4). En función del sexo, la misma comparación entre el grupo caso y el grupo control tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas.

Polimorfismo 5-HTTLPR

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,887$) en las frecuencias genotípicas del polimorfismo 5-HTTLPR entre pacientes con TA y el grupo de voluntarios sanos (tabla 5). Igualmente, las frecuencias alélicas fueron similares en ambos grupos ($p = 0,996$; OR: 0,98;

Tabla 3	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo T102C del gen 5-HT _{2A}	
	Trastorno angustia	Controles
Genotipo T102C*		
TT	18 (19,6%)	44 (25,3%)
TC	51 (55,4%)	84 (48,3%)
CC	23 (25%)	46 (26,4%)
Total	92	174
T102 C frecuencia alélica**		
T	87 (47,3%)	172 (49,4%)
C	97 (52,7%)	176 (50,6%)
Total	184	348
* χ^2 test; $p = 0,472$; ** χ^2 test con corrección de Yates; $p = 0,705$; OR: 0,92; IC 95%: 0,64-1,31.		

Tabla 4	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A-1438G del gen 5-HT _{2A}	
	Trastorno angustia	Controles
Genotipo A-1438G*		
AA	18 (19,6%)	44 (25,3%)
AG	51 (55,4%)	84 (48,3%)
GG	23 (25%)	46 (26,4%)
Total	92	174
A-1438G frecuencia alélica**		
A	87 (47,3%)	172 (49,4%)
G	97 (52,7%)	176 (50,6%)
Total	184	348

* χ^2 test; $p = 0,472$; ** χ^2 test con corrección de Yates; $p = 0,705$; OR: 0,92; IC 95%: 0,64-1,31.

IC 95%: 0,68-1,41) (tabla 5). Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas al realizar idénticas comparaciones en función del sexo.

Polimorfismo VNTR-5HTT

Los pacientes con TA tienen una mayor frecuencia del genotipo 12rep12rep que los controles. Sin embargo, dicha diferencia no es estadísticamente significativa ($p = 0,603$) (tabla 6). El alelo 12rep es el más frecuente tanto entre los pacientes con TA (0,67) como entre el grupo control (0,61),

Tabla 5	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 5-HTTLPR del gen 5-HTT	
	Trastorno angustia	Controles
Genotipo 5-HTTLPR*		
LL	32 (34,8%)	64 (36,8%)
LS	42 (45,7%)	74 (42,5%)
SS	18 (19,6%)	36 (20,7%)
Total	92	174
5-HTTLPR frecuencia alélica**		
L	87 (47,3%)	202 (58%)
S	97 (52,7%)	146 (42%)
Total	184	348

* χ^2 test; $p = 0,887$; ** χ^2 test con corrección de Yates; $p = 0,996$; OR: 0,98; IC 95%: 0,68-1,41.

Tabla 6	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo VNTR-5HTT del gen 5-HTT	
	Trastorno angustia	Controles
Genotipo VNTR-5HTT*		
12rep 12rep	44 (34,8%)	64 (36,8%)
12rep 10rep	34 (45,7%)	74 (42,5%)
10rep 10rep	13 (19,6%)	36 (20,7%)
10rep 9rep	1 (1,1%)	3 (1,7%)
Total	92	174
VNTR-5HTT frecuencia alélica**		
12rep	87 (47,3%)	202 (58%)
10rep	97 (52,7%)	146 (42%)
9rep	1 (0,5%)	3 (0,9%)
Total	184	348

* χ^2 test; $p = 0,603$; ** χ^2 test; $p = 0,359$.

sin obtenerse diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,359$) entre ambos grupos (tabla 6). Un análisis más detallado en función del sexo no pone de manifiesto diferencias entre los hombres y las mujeres, ni en los genotipos, ni en las frecuencias alélicas.

DISCUSIÓN

Los trastornos mentales, entre ellos el TA, se piensa que se constituyen en base a un modelo poligénico multifactorial en el que los trastornos surgen ante la combinación de varios genes que otorgan susceptibilidad al individuo. En esta susceptibilidad actúan también los factores ambientales³¹. La identificación de los genes responsables es compleja y los estudios de asociación son considerados como los más indicados para dicha identificación de genes en los pacientes con trastornos mentales. Se han realizado muy pocos estudios acerca del TA y su relación con distintos polimorfismos genéticos, si bien los más frecuentes son aquellos relacionados con la neurotransmisión serotoninérgica, probablemente derivados de la eficacia de los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (ISRS) en dicho trastorno.

En nuestro estudio no se encuentra ninguna relación entre el TA y los genotipos o frecuencias alélicas de los dos polimorfismos 5-HT_{2A}. El análisis en relación con el sexo no muestra tampoco asociación entre ellos. Estos resultados son concordantes con Ferh et al.⁴, que analizan la posible asociación del TA sin agorafobia con los genotipos y las frecuencias alélicas del polimorfismo T102C del gen 5-HT_{2A}. Sin embargo, en un estudio posterior³² se demuestra la existencia de asociación entre el genotipo CC y la frecuencia alélica C con el TA, y más en concreto con el TA con agorafobia,

siendo los resultados negativos en el caso de los pacientes que presentan TA sin agorafobia. Si se compara con la investigación que se presenta, en que la mayoría de los pacientes presentan TA con agorafobia (97,83 %), los resultados son contradictorios.

El interés por el estudio del polimorfismo genético 5-HTTLPR en pacientes con TA surge ante la presencia de determinados hallazgos en estudios de asociación en población general. Se observa, en primer lugar, la presencia de la forma corta (S) de dicho polimorfismo en individuos con rasgos de personalidad ansiosa³³⁻³⁵. En segundo lugar, el estudio del polimorfismo genético y la neuroimagen funcional^{36,37} ha demostrado una estrecha relación entre la expresión del alelo corto en forma homocigota o heterocigota y la mayor activación de la amígdala, que está implicada en el aumento del miedo y de la ansiedad de los individuos. En tercer y último lugar destaca en homocigotos de la variante corta del polimorfismo genético 5-HTTLPR una mayor presencia de síntomas depresivos ante acontecimientos vitales estresantes³⁸.

Sin embargo, los resultados que obtenemos son negativos, indicando ausencia de asociación de genotipo o frecuencias alélicas del polimorfismo 5-HTTLPR y el TA. Existen otros estudios que verifican la ausencia de dicha asociación en pacientes con TA de la población alemana, italiana, japonesa y estadounidense^{39,42}, e incluso en relación al sexo⁴². Ante la ausencia de resultados positivos, más recientemente se investiga la relación de los polimorfismos genéticos con posibles subtipos del TA. De esta forma, Sand et al.⁴³ analizan la posibilidad de efectos sinérgicos entre el polimorfismo 5-HTTLPR y un polimorfismo del gen de la enzima monoaminooxidasa A (MAO-A), sin encontrarse un aumento de riesgo genético en pacientes con TA. Tampoco la posible subdivisión del TA según distintos rasgos de personalidad muestra una asociación de dicho trastorno con el polimorfismo 5-HTTLPR⁴⁴. Por otra parte, estudios realizados en trastorno bipolar con y sin comorbilidad con TA^{45,46} ponen de manifiesto la posible existencia de dos subtipos genéticamente diferentes de trastorno bipolar, ya que en los casos no comórbidos existe asociación con el genotipo SS y la frecuencia alélica S, mientras que en el trastorno bipolar comórbido con TA no se demuestra dicha asociación. En otro estudio⁴⁷ se analiza la influencia de la distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del polimorfismo genético 5-HTTLPR según la respuesta farmacológica de los pacientes con TA tratados con ISRS. Se obtiene una mayor frecuencia alélica L en el grupo de no respondedores al tratamiento, por lo que se concluye que los distintos genotipos pueden tener una relevancia en el planteamiento de la terapéutica en el TA.

No se han encontrado estudios que avalen los resultados obtenidos para el polimorfismo genético VNTR-5HTT, donde ni los genotipos ni las frecuencias alélicas de dicho polimorfismo se asocian con el TA en la investigación que se presenta. Sin embargo, se ha descrito cómo el alelo 12rep es más frecuente en pacientes con trastorno de ansiedad ge-

neralizada⁴⁸, en pacientes con comorbilidad entre distintos trastornos de ansiedad⁴⁸ y en pacientes con trastorno obsesivo-compulsivo^{24,48}.

En resumen, nuestro estudio muestra la ausencia de asociación entre el TA y los genotipos y frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen del receptor 5-HT_{2A} o 5-HTT. No obstante, consideramos que para emitir consideraciones más definitivas se hace necesaria la replicación de nuestros resultados utilizando muestras más amplias de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Massat I, Souery D, Lipp O, Blairy S, Papadimitriou G, Dikeos D, et al. A European multicenter association study of HTR2A receptor polymorphism in bipolar affective disorder. *Am J Med Genet* 2000;96:136-40.
2. Sáiz PA, Morales B, G-Portilla MP, Álvarez V, Coto E, Fernández JM, et al. Apolipoprotein E genotype and schizophrenia: further negative evidence. *Acta Psychiatr Scand* 2002;105:71-5.
3. Arango V, Huang Y, Underwood MD, Mann JJ. Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. *J Psychiatr Res* 2003; 37:375-86.
4. Ferh C, Schleicher A, Szegedi A, Anghelescu I, Klavwe C, Hiemke C, et al. Serotonergic polymorphisms in patients suffering from alcoholism, anxiety disorders and narcolepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001;25:965-82.
5. National Institute of Mental Health. Health's Genetics Workgroup. Genetics and mental disorders. *Biol Psychiatry* 1999; 45:559-602.
6. Crowe RR, Noyes R, Pauls DL, Slymen D. A family study of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1983;40:1065-9.
7. Noyes R, Crowe RR, Harris EL, Hamra BJ, McChesney CM, Chaudhry DR. Relationship between panic disorder and agoraphobia. *Arch Gen Psychiatry* 1986;43:227-32.
8. Maier W, Lichtermann D, Minges J, Oehrlein A, Franke P. A controlled family study in panic disorder. *J Psychiatr Res* 1993; 27:79-87.
9. Mendlewicz J, Papadimitriou G, Wilmotte J. Family study of panic disorder: comparison with generalized anxiety disorder, major depression, and normal subjects. *Psychiatr Gen* 1993;3:73-8.
10. Weissman MM, Wickramaratne P, Adams PB, Lish JD, Horwath E, Charney D, et al. The relationship between panic disorder and major depression: a family study. *Arch Gen Psychiatry* 1993;50:767-80.
11. Heun R, Maier W. Relation of schizophrenia and panic disorder: evidence from a controlled family study. *Am J Med Genet* 1995; 60:127-32.
12. Slater E, Shields J. Genetic aspects of anxiety. En: Lader MH, editor. *Studies of anxiety*. London: Royal Medico Psychological Association; 1969; p. 62-71.
13. Torgersen S. Genetic factors in anxiety disorders. *Arch Gen Psychiatry* 1983;40:1085-9.
14. Torgersen S. Comorbidity of major depression and anxiety disorders in twin pairs. *Am J Psychiatry* 1990;147:1199-202.
15. Perna G, Caldirola D, Arancio C, Bellodi L. Panic attacks: a twin study. *Psychiatry Res* 1997;66:69-71.

16. Crowe RR. The genetics of panic disorder and agoraphobia. *Psychiatr Dev* 1985;3:171-85.
17. Crowe RR, Noyes R, Wilson AF, Elston RC, Ward LJ. A linkage study of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1987;44:933-7.
18. Nurnberger JI, Berrettini W. *Psychiatric genetics*. London: Chapman and Hall Medical, 1998.
19. Gratacòs M, Nadal M, Martín-Santos R, Pujana MA, Gago J, Peral B, et al. A polymorphic genomic duplication on human chromosome 15 is a susceptibility factor for panic and phobic disorders. *Cells* 2001;106:367-79.
20. Tabiner M, Youngs S, Dennis N, Baldwin D, Buis C, Mayers A, et al. Failure to find DUP25 in patients with anxiety disorders, in control individuals, or in previously reported positive control cell lines. *Am J Hum Genet* 2003;72:535-8.
21. Schumacher J, Otte AC, Becker T, Sun Y, Wienker TF, Wirth B, et al. No evidence for DUP25 in patients with panic disorder using a quantitative real-time PCR approach. *Hum Genet* 2003;114: 115-7.
22. Morilak DA, Somogyi P, Lujan-Miras R, Ciaranello RD. Neurons expressing 5-HT₂ receptors in the rat brain: neurochemical identification of cell types by immunocytochemistry. *Neuropsychopharmacol* 1994;11:157-66.
23. Morales B, Saiz PA, Álvarez V, Coto E, Fernández JM, González MP, et al. Variación de los genes 5-HT_{2A} y enzima conversiva de la angiotensina en pacientes esquizofrénicos. *Psiquiatr Biol* 2000; 7:1-7.
24. Sáiz PA, Morales B, García-Portilla MP, Bascarán MT, Coto E, Álvarez V, et al. Polimorfismos serotoninérgicos y trastorno obsesivo-compulsivo. *Psiquiatr Biológica* 2001;8:219-24.
25. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996; 274:1527-31.
26. Ebstein RP, Gritsenko I, Nemanov L, Frisch A, Osher Y, Belmaker RH. NO association between the serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and the Tridimensional Personality Questionnaire (TPQ) temperament of harm avoidance. *Mol Psychiatr Genet* 1997;7:45-7.
27. Nakamura T, Muramatsu T, Ono Y, Matsushita S, Higuchi S, Mizushima H, et al. Serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and anxiety-related traits in the Japanese. *Am J Med Genet* 1997;74:544-5.
28. Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, et al. Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen Sect* 1994;95:157-62.
29. World Medical Association. Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Amended by 41st World Medical Assembly. Hong Kong, 1989.
30. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
31. Gutiérrez Martínez B, Rosa de la Cruz A. Introducción a la metodología para la identificación de los factores hereditarios. En: Fañanás L, Saiz J, editores. *Manual de introducción a la genética en psiquiatría*. Barcelona: Masson, 2000; p. 37-65.
32. Inada Y, Yoneda H, Koh J, Sakai J, Himeí A, Kinoshita Y, et al. Positive association between panic disorder and polymorphism of the serotonin 2A receptor gene. *Psychiatry Res* 2003;118:25-31.
33. Greenberg BD, Li Q, Lucas FR, Hu S, Sirota LA, Benjamin J, et al. Association between the serotonin transporter polymorphism and personality traits in a primary female population sample. *Am J Genet* 2000;96:202-16.
34. Du L, Bakish D, Hrdina PD. Gender differences in association between serotonin transporter gene polymorphism and personality traits. *Psychiatr Genet* 2000;10:159-64.
35. Melke J, Landen M, Baghei F, Rosmond R, Holm G, Bjornorp P, et al. Serotonin transporter gene polymorphisms are associated with anxiety-related personality traits in women. *Am J Med Genet* 2001;105:458-63.
36. Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Kolachana B, Fera F, Goldman D, et al. Serotonin transporter genetic variation and the response of human amygdala. *Science* 2002;297:400-3.
37. Hariri AR, Weinberger DR. Functional neuroimaging of genetic variation in serotoninergic neurotransmission. *Genes Brain Behav* 2003;2:341-9.
38. Caspi A, Sugden K, Moffit TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, et al. Influence of life stress in depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003;301:386-9.
39. Deckert J, Catalano M, Heils A, Di Bella D, Friess F, Politi E, et al. Functional promoter polymorphism of human serotonin transporter: lack of association with panic disorder. *Psychiatr Genet* 1997;7:45-7.
40. Ishiguro H, Arinami T, Yamada K, Otsuka Y, Toru M, Shibuya H. An association study between a transcriptional polymorphism in the serotonin transporter gene and panic disorder in Japanese population. *Psychiatry Clin Neurosci* 1997;51:333-5.
41. Matsushita S, Muramatsu T, Kimura M, Shirakawa O, Mita T, Nakai T, et al. Serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and panic disorder. *Mol Psychiatry* 1997;2:390-2.
42. Hamilton SP, Heiman GA, Haghghi F, Mick S, Klein DF, Hodge SE, et al. Lack of genetic linkage or association between a functional serotonin transporter polymorphism and panic disorder. *Psychiatr Genet* 1999;9:1-6.
43. Sand P, Lesch KP, Catalano M, Bosi M, Syagailo YV, Okladnova O, et al. Polymorphic MAO-A and 5-HT-transporter genes: analysis of interactions in panic disorder. *World J Biol Psychiatry* 2000;1:147-50.
44. Samochovec J, Kmiński R, Hajduk A, Stépień G, Horodnicki J. Search for personality traits and other biological factors of anxiety disorders. *Xth World Congress on Psychiatric Genetics*. Bruselas, 2003.
45. Rotondo A, Mazzanti C, Dell'Osso L, Rucci P, Sullivan P, Bouanani S, et al. Catechol o-methyltransferase, serotonin transporter, and tryptophan hydroxylase gene polymorphisms in bipolar disorder patients with and without comorbid panic disorder. *Am J Psychiatry* 2002;159:23-9.
46. Rotondo A, Dell'Osso L, Bouanani S, Gonnelli C, Goldman D, Pardini L, et al. Comorbid panic disorder as a marker of genetic heterogeneity in bipolar disorder. San Francisco: American Psychiatric Association, 2003.
47. DiBella D, Perna G, Tentoni G, Bertani A, Cucchi M, Favaron E, et al. Panic disorder, treatment response and 5-HTT gene. San Francisco: American Psychiatric Association, 2003.
48. Ohara K, Suzuki Y, Ochiai M, Tsukamoto T, Tani K, Ohara K. A variable-number-tandem-repeat of the serotonin transporter gene and anxiety disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1999;23:55-65.

