

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**ESTUDIO DE ASOCIACIÓN BASADO EN FAMILIAS
DE LOS GENES APOE Y COMT Y LA
ESQUIZOFRENIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
M. en C. CARLOS ALFONSO TOVILLA ZARATE

DIRECTOR DE TESIS

DR. HUMBERTO NICOLINI

México D. F.

junio de 2009

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Humberto Nicolini, Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Grupo de Estudios Médicos y Familiares Carracci.

ASESORES

Dr. Juan C. Díaz, Profesor Investigador, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. Martha Yocupicio Monroy, Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra. Lorena Orozco, Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Dra. Ana Fresan. Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría. Ramón de la Fuente.

Dra. Sara Frías. Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría.

Dr. Mauricio Castañón. Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

AGRADECIMIENTOS

A la universidad autónoma de la ciudad de México, por la formación recibida así como por el apoyo económico para realizar este doctorado.

Al posgrado en Ciencias Genómicas por su disposición y la oportunidad de sentirme orgulloso de pertenecer a genómicas.

Al instituto nacional de psiquiatría “Ramón de la Fuente”, por las facilidades prestadas para la realización del presente trabajo.

A la universidad Juárez autónoma de Tabasco, por el apoyo económico.

Al Dr. Humberto Nicolini, por la oportunidad de colaborar en su grupo de trabajo.

A Beatriz Camarena, por tus valiosas aportaciones, tiempo en correcciones, formación en la genética psiquiátrica, instrucción y sobretodo por tu amistad.

A Magdalena Briones y Sandra Hernández por hacer del laboratorio un lugar para estar de buen humor, por su sinceridad y amistad, son la muestra de la bondad.

A los amigos del posgrado Alma, Vero, Paty y Nona, por su ayuda incondicional y apoyo moral

A los que no menciono por nombre pero se saben aludidos

DEDICATORIA

*“Agradecimiento hay en mi corazón,
cantos de alegría elevo con mi voz,
muchas son las cosas que mi Dios me ha
dado, por eso en agradecimiento le sirvo
a Jesús”*

A la memoria de mis padres Miguel Tovilla (22 de Junio 1999) y Elena Zarate (14 de febrero de 2005), gracias por el amor que me dieron y el camino que me enseñaron espero ser hallado siervo fiel.

A mi esposa Lilia López, no tengo duda que encontré el bien, antes de ti ¿como se definía la belleza?

A mis hermanos, Hazel, Elena y Marcelino, si que pasamos mucho juntos, queda mas, hay mucho por que alegrarse. Miguel, Fred, Maribel, María Jesús mil gracias por todo, desde Crimea hasta Yajalón les tengo muy presente.

A la comunidad de Fe, son lo máximo, no lo lograría sin ustedes.

CONTENIDO

CONTENIDO	5
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
1 ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA	10
1.1 ESQUIZOFRENIA	10
1.1.1 Clasificación de la Esquizofrenia	11
1.1.2 Síntomas de la Esquizofrenia	13
1.1.3 Epidemiología	14
1.1.4 Hipótesis etiológicas	14
1.1.5 Factores Medioambientales	15
1.1.6 Teoría del Neurodesarrollo	16
1.1.7 Neuroanatomía	20
2 ESTADO DEL ARTE	22
2.1 ESTUDIOS DE FAMILIAS	22
2.2 ESTUDIOS DE GEMELOS	23
2.3 ESTUDIOS DE ADOPCION	26
2.4 ESTUDIOS DE EPIGENÉTICA	27
2.5 GENÉTICA MOLECULAR DE LA ESQUIZOFRENIA	29
2.5.1 Ligamiento	29
2.5.5 Estudios de Asociación	34
2.5.6 Estudios de Asociación Casos-Controles	35
2.5.7 Estudios de Asociación Basados en Familias	38
2.5.8 Asociación en Presencia de Ligamiento	39

2.6	GENES CANDIDATOS	40
3	ANTECEDENTES PARTICULARES DEL TEMA	44
3.1	ApoE	44
3.2	COMT	51
4	IMPORTANCIA DEL ESTUDIO GENÉTICO DE LA ESQUIZOFRENIA	56
5	OBJETIVOS	59
5.1	OBJETIVO GENERAL	59
5.2	OBJETIVOS PARTICULARES	59
6	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	60
7	METODOLOGIA	61
7.1	TIPO DE ESTUDIO	61
7.2	SUJETOS	61
7.3	CRITERIOS DE INCLUSION	62
7.4	EVALUACIÓN CLINICA	62
7.5	GENOTIPIFICACIÓN	64
7.5.1	Genotipificación de ApoE	64
7.5.2	Genotipificación de ApoE-219G/T (rs405509)	64
7.5.3	Genotipificación de COMT (rs4680)	65
7.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
7.6.1	Estudio de asociación basado en poblaciones	66
7.6.2	Estudios de asociación basado en familias	68
8	RESULTADOS	70
8.1	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	70
8.1.1	Características de las Familias	70
8.1.2	Descripción de la muestra	71
8.1.3	Característica del grupo control	72
8.2	ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN BASADO EN POBLACIONES	72
8.2.1	Estudio de Asociación de ApoE y Esquizofrenia: Estudio de casos-control	72
8.2.2	Estudio de Asociación de ApoE y Esquizofrenia: Estudio de Casos	73
8.2.3	Asociación de las características clínicas con ApoE y Esquizofrenia	74
8.2.4	Asociación de ApoE-219G/T y esquizofrenia	77
8.2.5	Asociación de COMT y esquizofrenia	79
8.2.5.1	Asociación de las características clínicas de COMT y esquizofrenia	80

8.2.6	Estudio de Meta-Análisis	83
8.3	ESTUDIOS BASADO EN FAMILIAS	89
8.3.1	Estudio de Pares de Hermanos afectados	89
8.3.1.1	Sumario Estadístico	89
8.3.1.2	Datos de la muestra	89
8.3.1.3	Frecuencias alélicas y genotípicas de la muestra	90
8.3.2	Estudio de Asociación en Presencia de Ligamiento.	91
8.3.2.1	ApoE	91
8.3.2.2	Asociación basada en familia e inicio temprano de la esquizofrenia	92
8.3.3.1	ApoE-219G/T	93
8.3.3.2	Asociación basada en familia e inicio temprano de la esquizofrenia	94
8.3.3.3	Análisis de Haplotipos	94
8.3.3.4	COMT	96
9	DISCUSIÓN	97
9.1	ESTUDIO DE ASOCIACIÓN BASADO EN POBLACIONES	97
9.1.1	Estudios de asociación de ApoE y Esquizofrenia	97
9.1.2	Asociación de las características clínicas	100
9.1.3	Estudio de Meta-análisis	104
9.2	ESTUDIO DE ASOCIACIÓN BASADO EN FAMILIAS	106
10	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	111
11	ANEXO 1: ARTICULOS PUBLICADOS	122
12	ANEXO 2: PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES	135
13	ANEXO 3: PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES	136
14	ANEXO 4: COLABORACIONES	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla. 1. Dimensiones clínicas de la esquizofrenia.	7
Tabla 2. Ejemplos de estudios de asociación de genes candidatos	40
Tabla 3. Estudios de asociación de tipo casos-controles ApoE y esquizofrenia	48
Tabla 4. Estudios de asociación casos-control de COMT y esquizofrenia	50
Tabla 5. Frecuencia de genotipos y alelos de ApoE	72
Tabla 6. Distribución de las diferencias por género de acuerdo al genotipo de ApoE	73
Tabla 7. Distribución de la edad de inicio	74
Tabla 8. Análisis de las características clínicas por genotipo	75
Tabla 9. Criterios del MMSE dividido en portadores y no portadores de APOE.	76
Tabla 10. Frecuencia de genotipos y alelos de ApoE -219 en población mexicana.	76
Tabla 11. Frecuencia de la edad de inicio en pacientes con esquizofrenia	77
Tabla 12. Distribución de genotipos y alelos de <i>COMT</i> en pacientes con esquizofrenia, hermanos afectados y no afectados	78
Tabla 13. Distribución de las diferencias por género de acuerdo al genotipo de <i>COMT</i> en probandos con esquizofrenia sus hermanos afectados y no afectados.	79
Tabla 14. Distribución de la edad de inicio de la esquizofrenia	80
Tabla 15. Asociación de los genotipos de COMT y la gravedad de la enfermedad	81
Tabla 16. Estudios de asociación de casos y controles entre el alelo $\epsilon 4$	83
Tabla 17. Sumario Estadístico, de la muestra analizada por PEDINFO de S.A.G.E.	88
Tabla 18. Datos de Calidad de la muestra, analizados por MARMAKER de S.A.G.E	89
Tabla 19. Frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores	89
Tabla 20. Análisis de Alelos compartido por IPD del gen ApoE usando X-APL	90
Tabla 21. Análisis de asociación del polimorfismo ApoE y la edad de inicio en familias	91
Tabla 22. Análisis de Alelos compartido por IPD del marcador ApoE-219G/T	92
Tabla 23. Análisis de asociación del polimorfismo ApoE-219G/T y el inicio tardío.	93
Tabla 24. Pares de haplotipos transmitidos (ApoE $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ /ApoE-219G/T)	95
Tabla 25. Análisis de alelos compartidos por IPD del marcador COMT	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores de riesgo	12
Figura 2. Riesgo genético	21
Figura 3. Concordancia en gemelos con esquizofrenia	24
Figura 4. Idénticos por descendencia	29
Figura 5. Principales regiones de ligamiento reportadas a la fecha	31
Figura 6. Estudios de casos y controles	34
Figura 7. Modelo conceptual para la estratificación poblacional	35
Figura 8. Prueba de Transmisión de desequilibrio	37
Figura 9. Estrategia experimental seguida en el estudio	60
Figura 10. Análisis estadísticos empleados en el estudio	66
Figura 11. Distribución y estatus familiar	70
Figura 12. Distribución del tipo de familia	71
Figura 13. Efectos aleatorios, IC 95% y OR del meta-análisis	85
Figura 14. Gráfico de Galbraith.	86
Figura 15. Meta-análisis de los 19 trabajos del alelo $\epsilon 4$ de APOE y esquizofrenia	87
Figura 16. Gráfico de influencia	88

1 ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1.1 ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia es una enfermedad mental que se caracteriza principalmente por síntomas psicóticos, síntomas negativos y daño cognitivo. Los síntomas psicóticos se relacionan con la pérdida de contacto con la realidad, lo cual se manifiesta con creencias falsas (delirios) y experiencias perceptuales no experimentadas por otros (alucinaciones). Los delirios más comunes que presentan los pacientes son: de persecución, control y de grandiosidad. Las alucinaciones también se presentan de diferentes tipos: visuales, auditivas, olfativas, gustativas y táctiles, siendo las más comunes las auditivas. Por otro lado, los síntomas negativos corresponden a un estado de déficit; el término es utilizado para describir una reducción en conducta del paciente relacionada a un comportamiento hipotéticamente “normal”. Cuando se presentan los síntomas negativos las emociones básicas y los procesos conductuales están disminuidos o ausentes lo cual se manifiesta como empobrecimiento o disminución del pensamiento, de la afectividad, conducta y del lenguaje [1].

La esquizofrenia generalmente comienza en la adolescencia, alrededor de los 15 a 20 años de edad, aunque también puede aparecer en edades tardías y existen estudios que reportan que en mujeres el desarrollo de la esquizofrenia se presenta en edades más tardías que en hombres [2].

Los pacientes con esquizofrenia presentan inestabilidad en el trabajo, dificultad para establecer relaciones interpersonales y alta tendencia al suicidio [3]. En la mayoría de los casos, los pacientes requieren de largos períodos de tratamientos que implican altos costos sociales y económicos, sin embargo, el riesgo de sufrir episodios psicóticos o síntomas conductuales negativos persiste a lo largo de toda la vida del individuo afectado [4].

El estrés, la diferencia en la personalidad, la forma de enfrentar el padecimiento y la expresividad emocional en el entorno del paciente, inciden de manera importante en la sintomatología, la evolución de la enfermedad y en la interacción con otras personas [5].

1.1.1 Clasificación de la Esquizofrenia

Desde las primeras observaciones a la esquizofrenia se le denominó “demencia precoz”, por los síntomas que presentaban los pacientes, posteriormente se le denominó “hebefrenia” por considerarla un estado demencial de los jóvenes y más tarde debido a los trastornos psicomotores de la enfermedad se incluyó el término catatonia. Posteriormente Kraepelin en su tratado de las enfermedades mentales (1890) bajo el nombre de demencia precoz distinguía tres formas clínicas, la hebefrénica, la catatónica y la paranoide que compartían como característica común la pérdida de conexiones de la vida psíquica. Fue hasta 1911 que Eugene Bleuler propuso el término esquizofrenia al grupo de demencias precoces, porque observó que los pacientes no estaban dementes sino que presentaban un proceso de alteración de su capacidad “asociativa” que alteraban el pensamiento y originaban trastornos de la expresión simbólica de los procesos inconscientes.

Además, distinguió cuatro formas clínicas, paranoide, hebefrénica, catatónica y simple e identificó síntomas para cada una de ellas. La cuarta edición del Manual de diagnóstico y Estadística de los Trastornos Mentales (DSM-IV) [6] es una modificación de las formas clínicas propuestas por Bleuler. Es un esquema jerárquico que divide la esquizofrenia en cinco subtipos: paranoide, desorganizada, catatónica, indiferenciada y residual. Tabla 1.

Tabla. 1. Dimensiones clínicas de la esquizofrenia. (E.=esquizofrenia).

KRAEPELIN (1898)	BLEULER (1911)	DSM-IV (1994)
E. Paranoide	E. Paranoide	E. Paranoide
E. Hebefrénica	E. Hebefrénica	E. Desorganizada
E. Catatónica	E. Catatónica	E. Catatónica
	E. Simple	E. Indiferenciada
		E. Residual

La esquizofrenia paranoide se caracteriza principalmente por delirios y alucinaciones, con una relativa conservación de las funciones cognitivas y afectivas [7]. La esquizofrenia desorganizada se caracteriza por aumento o pérdida en funciones como el habla, la conducta y notable disminución del afecto. En la esquizofrenia de tipo catatónico se presentan al menos dos de los siguientes criterios: inmovilidad motora evidenciada por catalepsia o estupor, excesiva actividad motora, aparentemente sin objetivo o propósito alguno y no influenciada por un estímulo externo. Otras características que pueden presentar son extremo negativismo o mutismo, movimientos voluntarios muy particulares o gestos prominentes [7]. En la esquizofrenia indiferenciada, como su nombre lo indica el paciente presenta signos característicos de diferentes tipos de esquizofrenia como

paranoide, desorganizada y catatónica aunque estos no son prominentes para clasificarse en un tipo específico de esquizofrenia. Por último, la esquizofrenia tipo residual se presenta cuando el paciente no tiene delirios marcados, alucinaciones, desorden en el habla, aumento o presencia de conducta catatónica pero existe una continua evidencia de alteración en la conducta del individuo [7].

1.1.2 Síntomas de la Esquizofrenia

En la esquizofrenia están presentes múltiples síntomas que afectan todos los dominios de las funciones cognitivas y mentales, por ejemplo, el habla, las emociones, el razonamiento, la actividad motora y la percepción. Estos síntomas varían entre pacientes, creando el llamado espectro de síntomas de la esquizofrenia.

Los síntomas pueden incluir delirios, alucinaciones, habla desorganizada, comportamiento desorganizado (conducta bizarra), trastorno formal del pensamiento, daño en su conducta objetivo-específica (abolición), aplanamiento afectivo, incapacidad para encontrar el placer en actividades (anhedonia), pobreza en su habla y pensamiento (alogia) y pérdida de la atención. Estos síntomas son divididos en positivos y negativos. Los síntomas positivos reflejan un exceso o distorsión en el comportamiento, mientras que, los negativos reflejan una disminución o pérdida de funcionamiento “normal” [8, 9].

1.1.3 Epidemiología

La prevalencia de un desorden es definida como el número de casos presente en una población en un período de tiempo por 1000 individuos en riesgo. La tasa de incidencia es definida como el número anual de nuevos casos en una población dada por mil individuos en riesgo. La incidencia de la esquizofrenia en la población es de 0.17-0.57 por 1000 y la prevalencia es de 2.4-6.7 por 1000, su alta prevalencia refleja el curso crónico de la enfermedad [9]. La morbilidad en la población en general es de 1%.

Existen artículos que reportan variaciones en la prevalencia y la incidencia de la esquizofrenia en diferentes países [9], sin embargo, la Organización Mundial de la Salud reporta que la incidencia de la esquizofrenia es similar en diferentes países y que la sintomatología es muy parecida en las diferentes culturas, incluyendo países desarrollados y en vías de desarrollo [10, 11].

1.1.4 Hipótesis etiológicas

Se ha propuesto que factores genéticos y medioambientales participan en la etiología de la esquizofrenia. (Figura 1).

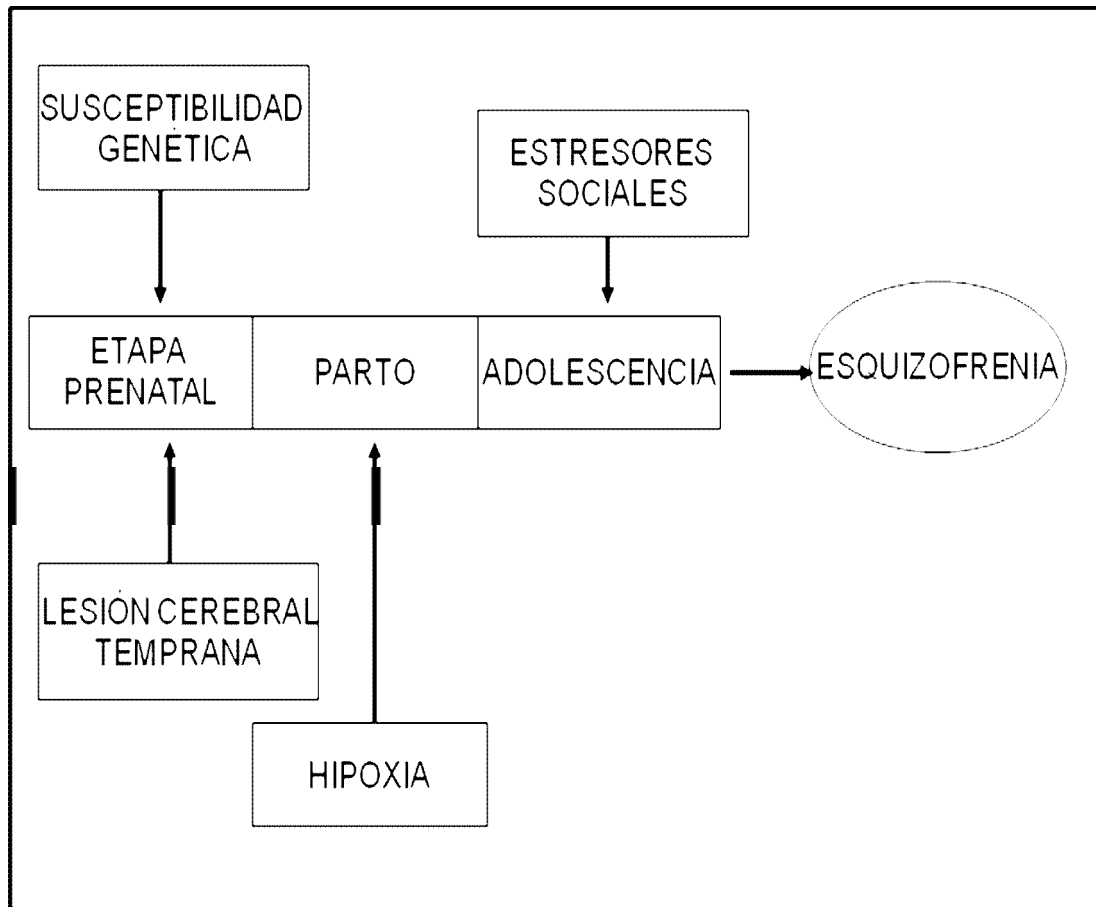


Figura 1. Factores de riesgo. Esquema que muestra las interacciones de los factores de riesgo para esquizofrenia

1.1.5 Factores Medioambientales

Los factores medioambientales en la esquizofrenia incluyen factores biológicos y psicosociales. Mediante estudios epidemiológicos se han identificados factores de riesgo asociados con esquizofrenia. Uno de los principales son los eventos prenatales, las investigaciones sugieren mayor frecuencia de esquizofrenia en los casos donde la madre estuvo expuesta a influenza, malnutrición, rubéola, diabetes, tabaco y drogas, por lo que se sugiere que, estos factores maternos

influenciados por los genes aumentan el riesgo de las complicaciones obstétricas y lesiones cerebrales [12, 13]. Otros factores de riesgo reportados son el nacimiento en invierno, complicaciones obstétricas como la hipoxia, bajo peso al nacer y gestación menor a 37 semanas [12, 13], con base en lo anterior, se ha propuesto que las complicaciones perinatales severas pueden tener consecuencias en el neurodesarrollo y pueden predisponer hacia el desarrollo de la esquizofrenia, incluso si el riesgo genético es bajo [14]. Otros factores de riesgo estudiados son: demográficos, nivel socioeconómico, nacimiento en invierno y el estado civil [15].

1.1.6 Teoría del Neurodesarrollo

Algunas investigaciones aportan evidencia de que las alteraciones estructurales en el sistema nervioso central son el resultado de anomalías en el desarrollo temprano del cerebro [16]. Es importante recordar que el neurodesarrollo no termina con el nacimiento, sino que continúa a lo largo de la vida, aunque su extensión y características probablemente varían de etapa en etapa. Los principales estadios de la formación del sistema nervioso central son: la formación del tubo neural, comienza con la invaginación del ectodermo que posteriormente progresa a su disposición en forma de tubo y a la formación de bulbos (vesículas cerebrales primarias), que dan origen al cerebro, cerebelo y tallo cerebral. La proliferación, en la cual las células cerebrales neocorticales maduras se originan a partir de las zonas ventriculares y subventriculares. El fenómeno de migración, en

el cual las células al terminar su división a nivel periventricular se disponen de manera radial y se desplazan, guiadas por una fibra glial hacia su destino final. Durante este proceso existe una interacción celular intensa, entre diferentes generaciones de neuronas. En este proceso se comienzan a formar los circuitos que permiten el procesamiento en paralelo de la información, desde y hacia diferentes zonas del cerebro. El proceso de diferenciación se prolonga hasta la segunda década de la vida extrauterina y comprende la diferenciación neuronal anatómica y la funcional. Durante este proceso suceden múltiples cambios moleculares intracelulares y de interconexión neuronal, que son vitales para el desarrollo de axones, dendritas, moléculas de membrana y receptores y los sistemas de neurotransmisión al que pertenecerán. Sinapsis, apoptosis y poda dendrítica. Durante el último trimestre de la gestación se aumenta la interacción sináptica, fenómeno que en el ser humano se mantiene, e inclusive, aumenta durante la vida postnatal, bajo el influjo de diferentes sistemas de neurotransmisión. Posteriormente la actividad sinaptogénica comienza un lento proceso regresivo de apoptosis (muerte celular) y poda dendrítica. La maduración del sistema nervioso central, incluye esta remodelación y afinamiento de las conexiones, organización y funcionalidad del sistema. [17]. En la literatura existe evidencia de que cambios continúan ocurriendo en el cerebro humano durante los primeros meses de vida y durante la adolescencia lo que justifica la plasticidad cerebral [18], durante esta etapa se presenta el proceso llamado de arborización o sinaptogénesis que va a crear un alto número de conexiones esto permite que aumente drásticamente el número de conexiones sinápticas, de manera tal que, su número excede al del cerebro adulto [19, 20]. Durante la adolescencia se

eliminan aquellas conexiones que no son utilizadas, quedando reducido el número de sinapsis a los niveles propios de la edad adulta. La llamada poda neuronal se complementa con la mielinización o fortalecimiento de las sinapsis, lo anterior está en relación a factores biológicos y sociales que pueden alterar la respuesta del adolescente y en especial pueden afectar la cognición [20].

Por otro lado, se sugiere que, alteraciones en el neurodesarrollo podrían explicar la aparición de los síntomas de la esquizofrenia principalmente durante la adolescencia. Por lo que se ha sugerido que el trastorno del neurodesarrollo impide la migración y diferenciación neuronal, lo que hace vulnerable al individuo a los factores de estrés ambientales y limita el proceso de sinaptogénesis (formación de sinapsis), especialmente a nivel del lóbulo frontal, durante la infancia [21]. Como se mencionó anteriormente, en la adolescencia se produce la apoptosis neuronal y se aumenta se intensifican los factores de estrés ambientales y sociales, lo cual supone un estrés intenso para el adolescente por lo que en el individuo que presenta alteraciones en el neurodesarrollo harían eclosión los síntomas de la esquizofrenia [21-24]. Sin embargo, se ha propuesto que este proceso tiene un control genético, por lo que es importante poder estudiar los genes que participan en el neurodesarrollo normal del cerebro y por lo tanto si tienen mutaciones dan como resultado la esquizofrenia, uno de los genes que se ha observado participa en el neurodesarrollo es el gen de la apolipoproteína E (ApoE).

En el sistema nervioso central (SNC) la ApoE es sintetizada y secretada principalmente por astrocitos y macrófagos. Es la principal apolipoproteína en el cerebro y líquido cefalorraquídeo, en las membranas mielínicas y en la regulación

del crecimiento neuronal [25]. Existe evidencia de que ApoE participa en la movilización y redistribución de lípidos durante el desarrollo del sistema nervioso y en la regeneración de nervios periféricos [26, 27]. Estudios realizados en cultivos de células de ganglio de retina de ratas, proponen que una sinaptogénesis masiva requiere grandes cantidades de colesterol, el cual que es provisto por las células glía; sin embargo, el colesterol necesario es entregado mediante las apolipoproteínas, lo que sugiere que la capacidad de las neuronas del SNC para formar sinapsis está limitada por la disponibilidad de colesterol [27], por lo tanto, se ha propuesto que las diferentes isoformas de ApoE pueden afectar los procesos intracelulares que son responsables de la regulación del crecimiento y de la ramificación neuronal [27].

En trabajos dirigidos a conocer los efectos de ApoE $\epsilon 3$ y ApoE $\epsilon 4$ en el desarrollo neuronal, se propone que ApoE $\epsilon 3$ en presencia de β -VLDL aumenta el crecimiento neuronal mientras que ApoE $\epsilon 4$ lo disminuye. Lo anterior postula que las isoformas de la ApoE pueden modular modificaciones tardías en las conexiones neuronales y de esta manera podrían participar en la patogénesis de los desórdenes neurodegenerativos, propiciando que ApoE $\epsilon 4$ podría tener un efecto nocivo posiblemente impidiendo, o no apoyando, la remodelación en las conexiones sinápticas [28].

Por otro lado, estudios pre-clínicos hechos en primates han demostrado que las habilidades cognitivas están relacionadas con la actividad dopaminérgica en la corteza dorso lateral frontal [29], resultados similares se han observado en ratas. En 1997 Jentsch y cols., reportaron que al administrar fenciclidina en ratas se observó déficit cognitivo que afectó principalmente la memoria de trabajo, este

deterioro se presenta de forma dosis-dependiente de fármaco [30]. Los cambios observados a nivel neurobiológico se atribuyeron al fármaco, por lo que se acepta que la actividad dopaminérgica en la corteza frontal está asociada con el dominio cognitivo.

Por otro lado, reportes en humanos concuerdan con la evidencia experimental preclínica de que la neurotransmisión dopaminérgica participa de manera importante en la cognición, ya que al administrar fármacos agonistas de receptores a dopamina se ha observado mejoría en los dominios cognitivos dependientes de la corteza frontal, estas mejoras se han reportado principalmente en la memoria de trabajo y en funciones ejecutivas [31].

Para intentar explicar cómo es que la actividad dopaminérgica en la corteza prefrontal está relacionada con la cognición se ha propuesto el estudio de la actividad sináptica de la dopamina. La actividad sináptica más estudiada es la relacionada con los niveles de recaptación y los metabolitos de degradación y las enzimas involucradas en el proceso como es la catecol-o-metil-transferasa (COMT).

1.1.7 Neuroanatomía

La principal y más frecuente diferencia neuroanatómica entre pacientes y personas no enfermas (controles) es el aumento en el tamaño en el sistema ventricular cerebral, especialmente el tercer ventrículo y los laterales. Se conoce que el alargamiento ventricular es acompañado por reducciones en el volumen del

cerebro y de la materia gris cortical [16]. Regiones como el lóbulo frontal, amígdala, hipocampo, parahipocampo, tálamo, lóbulo medial temporal también se ha observado que presentan menor volumen en los pacientes con esquizofrenia que en el grupo control [16, 32].

Mediante la tomografía de emisión de positrones (PET), técnica que mide el flujo sanguíneo cerebral in vivo, se han identificado disfunciones en el circuito normal cerebral. Las principales anormalidades en el flujo sanguíneo que se han observado en los pacientes esquizofrénicos son en la región frontal, tálamo y cerebelo [33, 34].

Otra técnica utilizada es la imagen mediante resonancia magnética funcional (fMRI) que utiliza la hemoglobina desoxigenada como un marcador interno y que mide la actividad en regiones específicas de cerebro cuando a los pacientes se le realizan pruebas cognitivas. Son diversas las anormalidades en la actividad neural que se han observado en los pacientes con esquizofrenia en comparación con los controles principalmente en las áreas cerebrales temporal y frontal. En su conjunto estas diferencias observadas ofrecen evidencias de interrupciones en los circuitos funcionales más que estructurales [34, 35]. Con base en lo anterior se ha propuesto que cambios estructurales durante la adolescencia temprana y tardía pueden ser críticos para el desarrollo de la esquizofrenia por lo que se propone la hipótesis del neurodesarrollo como un modelo que explique la aparición de la esquizofrenia.

2 ESTADO DEL ARTE

2.1 ESTUDIOS DE FAMILIAS

Se le denomina probando al primer integrante de una familia que recibe el diagnóstico de una enfermedad. El riesgo de padecer esquizofrenia en la población general es del 1%, sin embargo, el riesgo a desarrollar esquizofrenia entre familiares del probando con esquizofrenia crece conforme aumenta el grado del parentesco genético. En la figura 2, se puede observar el incremento de riesgo a padecer la enfermedad de acuerdo con el grado de parentesco, así, el riesgo en sobrinos es de 2%, en hermanos de 9%, en hijos del 13% y en gemelos monocigotos de 48% [4]. Por otro lado, estudios recientes como el de Kendler y cols., (1985) [36] utilizaron los criterios de diagnóstico para esquizofrenia del DSM-III y observaron que el riesgo entre familiares de primer grado disminuía a sólo 3.7%, sin embargo, el riesgo que observaron en la población general fue de 0.2%, por lo que el riesgo entre familiares sigue siendo muy alto comparado con la población control. De manera muy interesante observaron que cuando en una familia existían antecedentes de psicosis no afectiva el riesgo aumentaba muy drásticamente hasta un 8.6%. La evidencia aquí presentada muestra que, existe un mayor riesgo en las familias de pacientes con esquizofrenia y que los factores familiares influyen en el desarrollo de la enfermedad [37], sin embargo, no aportan evidencia de la contribución del medio ambiente, es decir, no aportan evidencia si el medio ambiente o el tipo de la alimentación son los responsables de la

agregación familiar, por lo que es necesario conocer esto mediante el uso de otras metodologías como son los estudios en gemelos y los estudios de adopción.

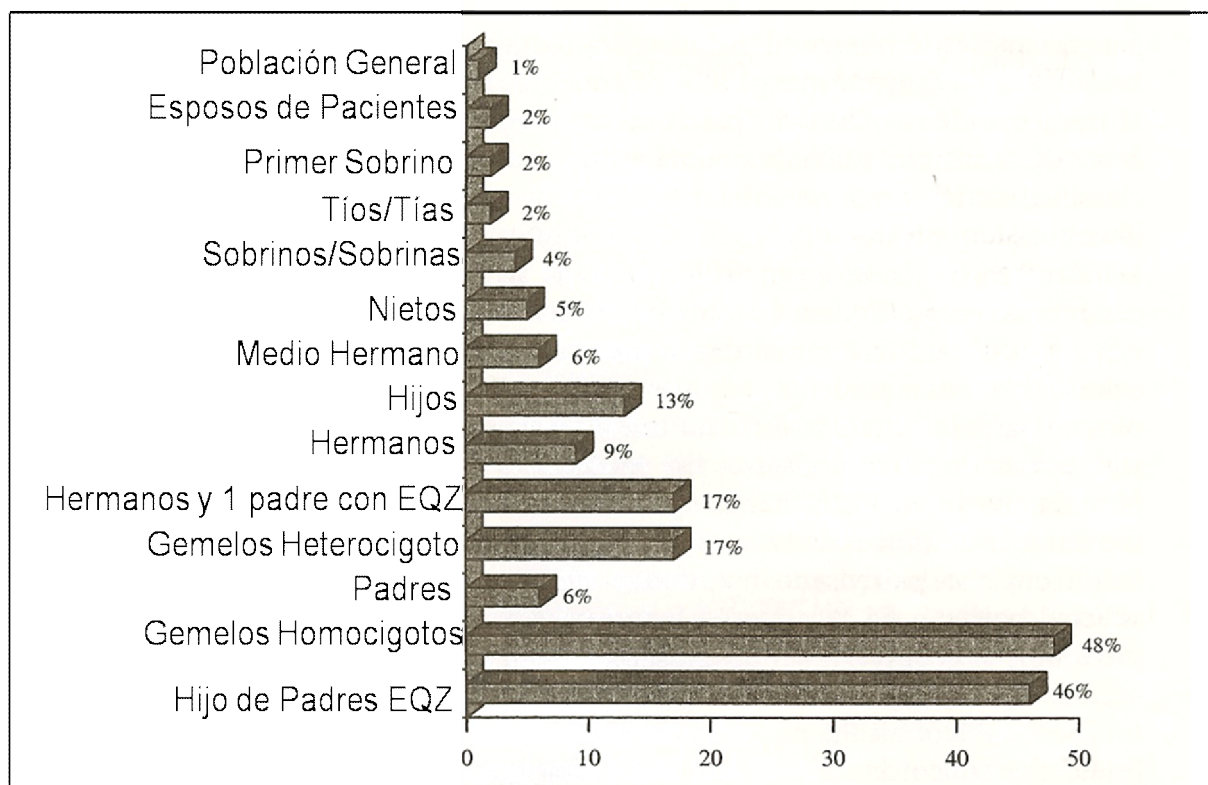


Figura 2. Riesgo genético. Riesgo para esquizofrenia en población general y en familiares. (Adaptada de Gottesman 1989).

2.2 ESTUDIOS DE GEMELOS

Aunque los estudios de familias nos muestran que la esquizofrenia tiene un elemento familiar, éste no necesariamente es genético, por lo que surge la necesidad de realizar estudios en los que se determinen los factores genéticos

que contribuyen al desarrollo de la esquizofrenia. Una metodología ampliamente utilizada son los estudios de concordancia de la enfermedad en gemelos. La principal estrategia utilizada es comparar la concordancia de la enfermedad entre los gemelos monocigotos y entre los gemelos dicigotos, cuando ambos gemelos presentan la esquizofrenia son llamados concordantes, por el contrario, si solo un gemelo presenta la enfermedad es llamado discordante. Los gemelos monocigotos son genéticamente idénticos, mientras que los gemelos dicigotos sólo comparten el 50% de la información genética, por lo que, en gemelos que comparten su medio ambiente una mayor concordancia en los gemelos monocigotos que en los dicigotos sugiere la influencia genética. Usando esta metodología existen reportes clásicos de estudios en gemelos que presentan una tasa de concordancia mayor en gemelos monocigotos que en gemelos dicigotos [36]. Kendler y cols. (1993), reportan una concordancia del 53% en gemelos homocigotos y 15% en gemelos heterocigotos. Otros reportes presentan una tasa de concordancia de 48% en gemelos homocigotos comparada con 9.5% en gemelos heterocigotos. (Figura 3). Estudios recientes utilizando criterios de inclusión para esquizofrenia basados en el DSM-III-R como el de Cardno y Gottesman (2000) en el que combinaron sus datos con otros reportes de gemelos con esquizofrenia, observaron en gemelos monocigotos el 50% de concordancia y en gemelos dicigotos el 4.1%. Cuando el análisis se realizó utilizando los criterios de diagnóstico del ICD-10 observaron el 42.4% de concordancia en gemelos monocigotos y el 3.9% en gemelos dicigotos, por lo que la heredabilidad fue calculada en un 88% de acuerdo con los criterios de DSM-III-R y del 83% bajo los criterios del ICD-10 [38].

La discordancia para la esquizofrenia en gemelos monocigotos ha sido interpretada como evidencia del papel que juega el ambiente en la etiología de la esquizofrenia, sin embargo, cuando se compara la de concordancia y la heredabilidad se puede observar que la carga genética está participando. Tomando en su conjunto estos trabajos se sugiere que los factores genéticos contribuyen a las diferencias individuales en la esquizofrenia, y dejan ver la complejidad de este desorden psiquiátrico, pero además, abre la puerta para la investigación hacia conocer éstos genes que participan en la esquizofrenia.

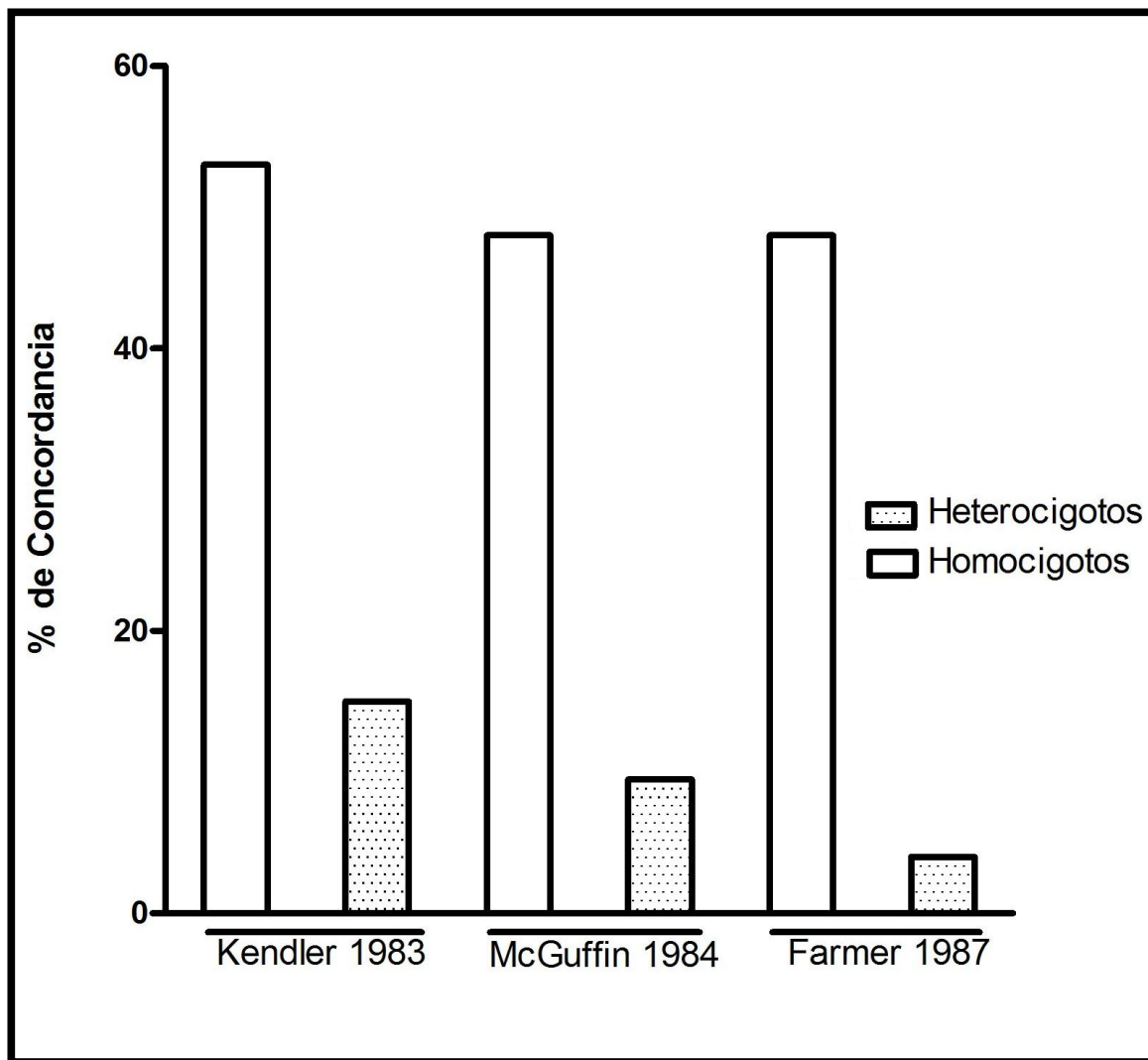


Figura 3. Concordancia en gemelos con esquizofrenia. Concordancia entre gemelos homocigotos y heterocigotos que muestra que los factores genéticos participan en la etiología de la esquizofrenia.

2.3 ESTUDIOS DE ADOPCION

Otros de los estudios que aportan evidencia de la participación de los factores genéticos y ambientales son los estudios de adopción, ya que cuando hijos adoptados por familias con por lo menos un integrante con esquizofrenia comparten el mismo medio ambiente, entonces la enfermedad podría deberse al medio y no a factores genéticos, sin embargo, en los estudios de adopción se

controlan los factores medioambientales. En estos estudios se comparan la probabilidad de desarrollar esquizofrenia en hijos dados en adopción a familias donde esta presente la enfermedad, otra metodología empleada mide la probabilidad de desarrollar la esquizofrenia en sujetos dados en adopción de familias donde no está presente la enfermedad. En todos los estudios realizados usando estos criterios se ha observado un mayor porcentaje de la enfermedad en los hijos de padres biológicos con esquizofrenia (15.8%) que en los hijos donde los padres biológicos no son esquizofrénicos (1.8%) [39-41]. El estudio más reciente trabajo de adopción y esquizofrenia fue publicado en 1991 por Tienari y cols., [42]. Ellos observaron una prevalencia de 9.4% en los hijos dados en adopción cuyo padres biológicos padecían esquizofrenia y un 1.2% en los hijos adoptados cuyos padres biológicos no sufrían la enfermedad. Con base en lo anterior se puede concluir que los factores genéticos y medioambientales participan en el desarrollo de la esquizofrenia. Esto abre la posibilidad de estudiar estos factores genéticos que predisponen o protegen al desarrollo de la esquizofrenia.

2.4 ESTUDIOS DE EPIGENÉTICA

La epigenética se define como la regulación de varias funciones genómicas que incluyen la expresión genética no basada en la secuencia de ADN sino la controlada por las modificaciones hereditarias y las modificaciones químicas del ADN y/o por la estructura de la cromatina [43]. El más común de los marcadores epigenéticos es la metilación del ADN que es una modificación covalente de ADN. La metilación de la citosina ocurre en la posición 5' del anillo de pirimidina y es

catalizada por ADN metil transferasa [44]. Otro de los marcadores epigenéticos es la modificación de la cromatina. Las histonas son proteínas nucleares que forman el nucleosoma y se sabe que cada histona tiene un “cola” que sobresale del nucleosoma y que puede ser modificado de diferentes maneras como son la fosforilación, ubiquitanación, acetilación y metilación. Se conoce que las modificaciones en las histonas alteran la estructura de la cromatina permitiendo que la cromatina forme un poro mayor al que normalmente formaría donde puede unirse complejos transcripcionales [45, 46]. Por lo que se propone que agentes medioambientales alteran el estatus epigenético de genes o de genomas, que podría estar actuando para el desarrollo de la esquizofrenia [43, 47, 48]. La literatura presenta evidencia cuando se compara los grupos de esquizofrénicos con controles de que, factores como la dieta, el estrés, el consumo de drogas (canabinoides) y el consumo de hormonas pudieran influir en la alteración epigenética, aunque se propone que estas epimutaciones sólo se observan a lo largo del tiempo [43, 49].

2.5 GENÉTICA MOLECULAR DE LA ESQUIZOFRENIA

Los estudios de “ligamiento” y “asociación” son estrategias que utilizan marcadores de ADN y son utilizadas en la búsqueda de genes que pudieran tener un papel en la susceptibilidad al desarrollo de alguna enfermedad.

2.5.1 Ligamiento

Los estudios de ligamiento contribuyen en la búsqueda de regiones cromosomales donde probablemente se encuentre un marcador polimórfico responsable de la etiología de la enfermedad. El ligamiento genético ocurre cuando dos marcadores genéticos de los cuales conocemos su localización (loci) están cerca uno del otro en el mismo cromosoma, de manera que durante la recombinación segregan juntos ó menos separado de lo esperado al azar (Menos de 0.5), es decir, existe una desviación de la ley de Mendel [37] (Figura 4). Existen dos metodologías empleadas en los estudios de ligamiento, el ligamiento paramétrico y el ligamiento no paramétrico.

Los estudios de ligamiento paramétrico son herramientas muy informativas que se basan en el método llamado de la máxima probabilidad y se aplican principalmente en familias nucleares extensas y en familias de varias generaciones. Para este tipo de análisis, las familias que presentan varios casos son las más informativas y es necesario especificar en el análisis el modo de herencia, la penetrancia, la frecuencia génica y el porcentaje de fenocopias. Se dice que existe un ligamiento si el alelo particular del marcador genético y el gen

de la enfermedad segregan más frecuentemente en los miembros afectados que en los no afectados, es decir, los genes que están en ligamiento recombinan durante la meiosis con un valor menor al 50% que el valor esperado, por lo que se asume que están segregando juntos y por lo tanto sus loci son muy cercanos entre si. La medida del ligamiento paramétrico es el LOD (logaritmo de probabilidades) y existe un ligamiento cuando el LOD es superior a 3, cuando es superior a 2 e inferior a 3 se dice que está presente un ligamiento sugestivo. A pesar de ser una metodología muy utilizada presenta la desventaja que en enfermedades no mendelianas como la esquizofrenia, no es posible especificar cuál es la frecuencia del alelo de riesgo, el modo de herencia y la penetrancia, por lo que fue necesario el desarrollo de otro método: el ligamiento no paramétrico.

La base de este tipo de análisis consiste en observar los alelos que los padres transmiten a los hijos enfermos y se dice que está presente en ligamiento si los hijos afectados presentan una mayor frecuencia del alelo denominado de riesgo. En los estudios de ligamiento no paramétrico se encuentra, el método de “pares de hermanos afectados”, que identifica los llamados alelos “idénticos por descendencia” (IPD) los cuales son las variantes heredadas a los hermanos afectados (Figura 4) y que provienen del mismo progenitor [50]. En estos estudios se espera encontrar que la probabilidad de que los hermanos afectados compartan la misma variante genética es mayor que la esperada por un proceso al azar. Una de las principales bondades de esta metodología es que evita problemas de estratificación poblacional y que no es necesario conocer el modo de herencia, penetrancia o frecuencia alélica. Las desventajas de este método

consisten en que requiere gran número de familias con hermanos afectados y que no se puede estimar la distancia entre el alelo de riesgo y el de la enfermedad.

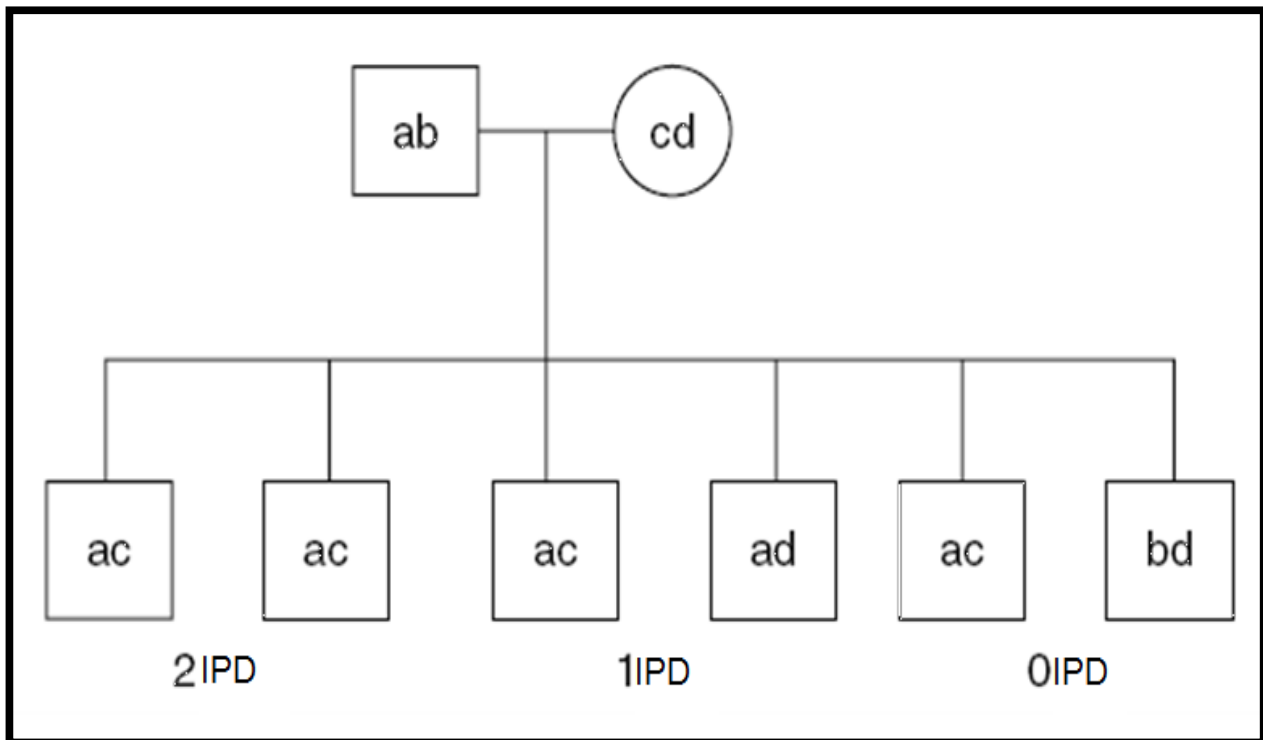


Figura 4. Idénticos por descendencia. Dos individuos son llamados pares de hermanos afectados cuando comparten alelos *idénticos por descendencia* (ipd) si heredan por lo menos una copia de sus padres.

Los estudios de ligamiento a lo largo del genoma (genome-wide) en familias con múltiples afectados es un método frecuentemente usado para identificar genes que contribuyen en la etiología de la esquizofrenia. Utilizando esta metodología desde mediados de los años 90' a la fecha, se ha logrado la identificación de varias regiones cromosomales que presentan ligamiento. Las principales regiones propuestas que podrían ser susceptibles a esquizofrenia son: 22q11-12, 6p24-22,

8p22-21 y el 6q [50-52]; más recientemente se han reportado las regiones 1p36, 18p y 5q35 [53]. Además, existen reportes de otras áreas en donde el ligamiento con esquizofrenia no es fuerte, pero sí reportan ligamiento sugestivo, estas incluyen las regiones 13q14.1-q32 [54-57]; 5q21-q33 [58, 59], 10p15p11 [59], y 1q21-22 [54]. La figura 5 representa las principales regiones donde se ha reportado ligamiento (Figura 5).

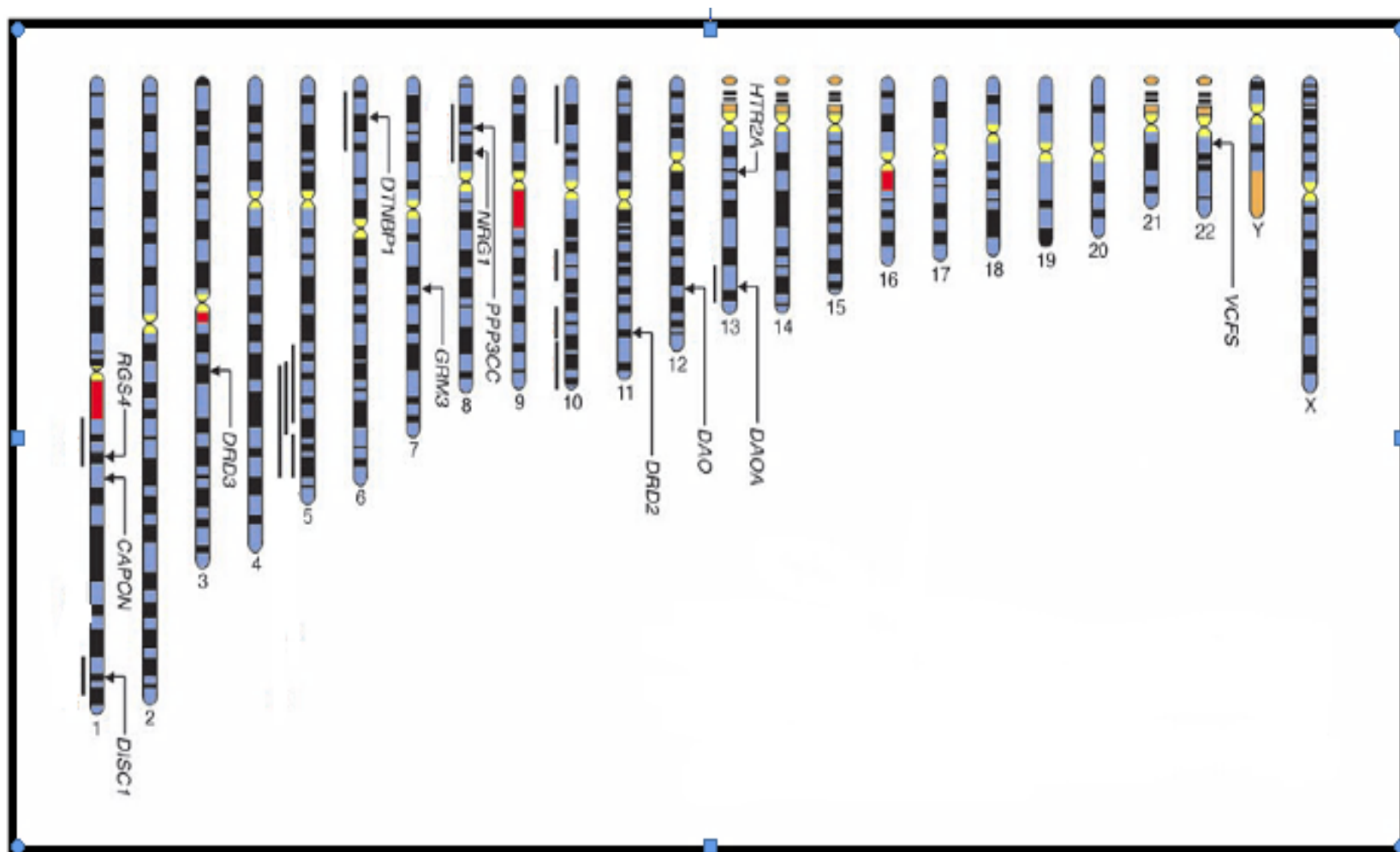


Figura 5. Principales regiones de ligamiento reportadas a la fecha. Adaptado Liu 2003

2.5.5 Estudios de Asociación

Los estudios de ligamiento han sido ampliamente usados porque identifican regiones con genes que son importantes en la etiología de la enfermedad, sin embargo, no identifican un gen específico de pequeño efecto que contribuye de un modo aditivo con otros genes o con el medio ambiente. Sin embargo, los genes de efecto pequeño se han propuesto mediante los estudios de asociación. Los estudios de asociación escogen genes con base en su localización y su función farmacológica y les denomina "*genes candidatos*". Una vez que los genes candidatos se han seleccionado, la siguiente etapa es probar si este gen está asociado con la enfermedad mediante los llamados estudios de asociación. Los estudios de asociación tienen dos principales ventajas sobre los estudios de ligamiento en esquizofrenia: primero, es más fácil y menos costoso encontrar pacientes con esquizofrenia y controles sanos que el obtener familias con numerosos pacientes con esquizofrenia. Segundo, son capaces de identificar genes de pequeño efecto. Sin embargo, comparados con los estudios de ligamientos presenta la desventaja que éstos estudian grandes regiones cromosomales mientras que los estudios de asociación estudian alelos de manera individual.

2.5.6 Estudios de Asociación Casos-Controles

El estudio de asociación casos-control es una metodología usada muy frecuente para investigar el efecto de la variabilidad genética en la susceptibilidad de una enfermedad. En éstos, se describe la frecuencia con que un alelo o genotipo específico está presente en los sujetos afectados (grupo de casos) y se compara con un grupo control. Si la presencia de un alelo es mayor en los casos que en los controles, se dice que existe asociación y sugiere que el alelo podría estar involucrado en el desarrollo de la enfermedad o modificando las manifestaciones clínicas de la enfermedad (factor de riesgo), sin embargo, si es mayor en los controles se dice que, el alelo podría estar actuando como un factor protector al desarrollo del fenotipo [50] (Figura 6). Como se mencionó la medida de asociación puede ser cualitativa, con una presencia o una ausencia de una asociación significativa, pero también puede ser cuantitativa, con una fuerza de asociación evaluada por Odds Ratio (OR) que es la tasa de probabilidad para la población en estudio. Los estudios casos-controles pueden ser realizados con un solo marcador o una combinación de marcadores (haplotipos). Por otro lado, a los estudios de asociación se les ha usados como herramientas estadísticas para probar las frecuencias alélicas de algún polimorfismo que esta potencialmente cerca ó en desequilibrio de ligamiento (DL) con un gen que participa en la fenotipo analizado. Un fenotipo puede ser influenciado por un alelo específico, y el polimorfismo de un marcador genético puede ser asociado con este fenotipo si están en DL. El DL se refiere a una distancia entre 2 alelos que tienen poca distancia en un cromosoma y sin embargo, infrecuentemente separados uno de otro por la recombinación.

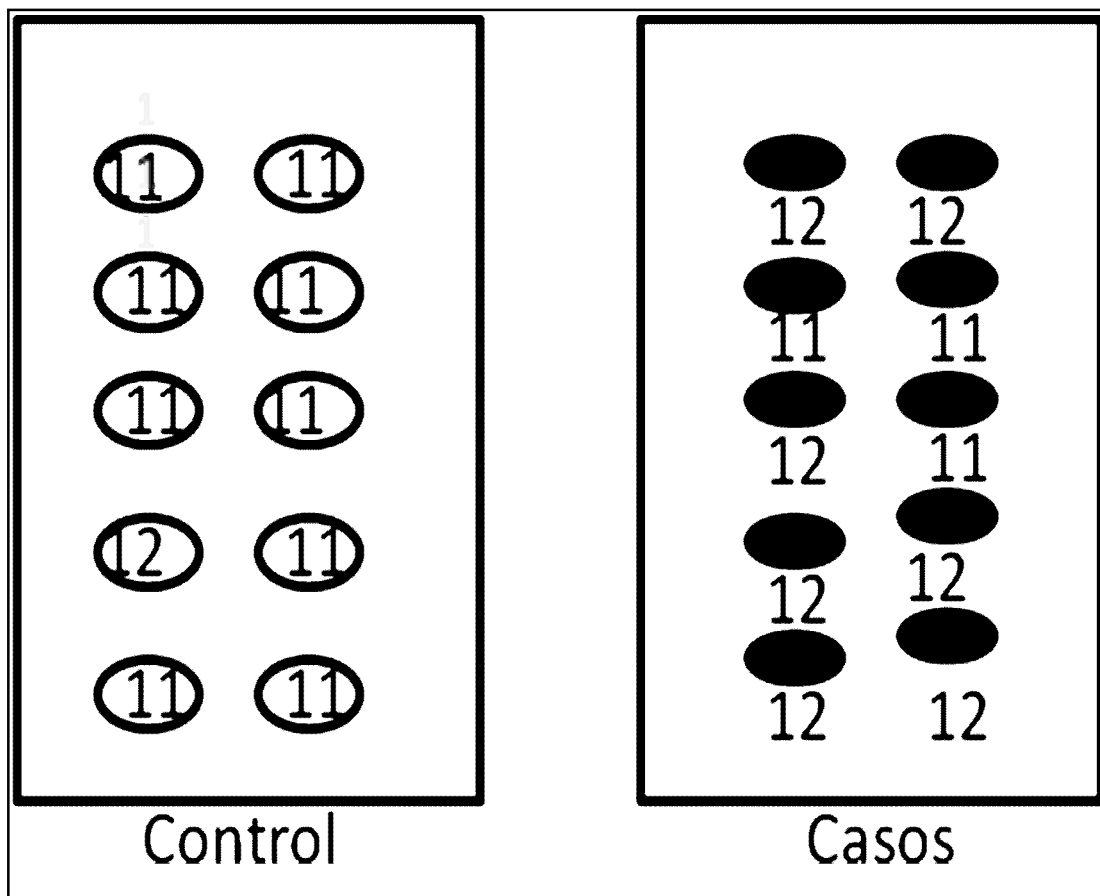


Figura 6. Estudios de casos y controles. En este ejemplo se puede observar que existe asociación del alelo 2 con la enfermedad ya que se observa más frecuente en el grupo de casos que en los controles.

Sin embargo, los resultados de los estudios de asociación en enfermedades como la esquizofrenia han tenido poca reproducibilidad y hay dificultades en localizar un gen específico, esto puede deberse entre otras razones por los errores en la vía de selección y consiste en la manera en que los casos y controles son seleccionados (inapropiado muestreo de casos y control), así como, la exactitud de la información obtenida de ellos (errores en la vía de información). Otra limitante es el llamado efecto de la estratificación poblacional, esto se basa en que

puede haber un grupo de la población en el cual el gen candidato y el desorden pueden ser comunes pero sin tener una relación causal (Figura 7). Un estudio que evita el problema de estratificación poblacional presente en los estudios de casos-controles son los estudios de asociación basados en familias.

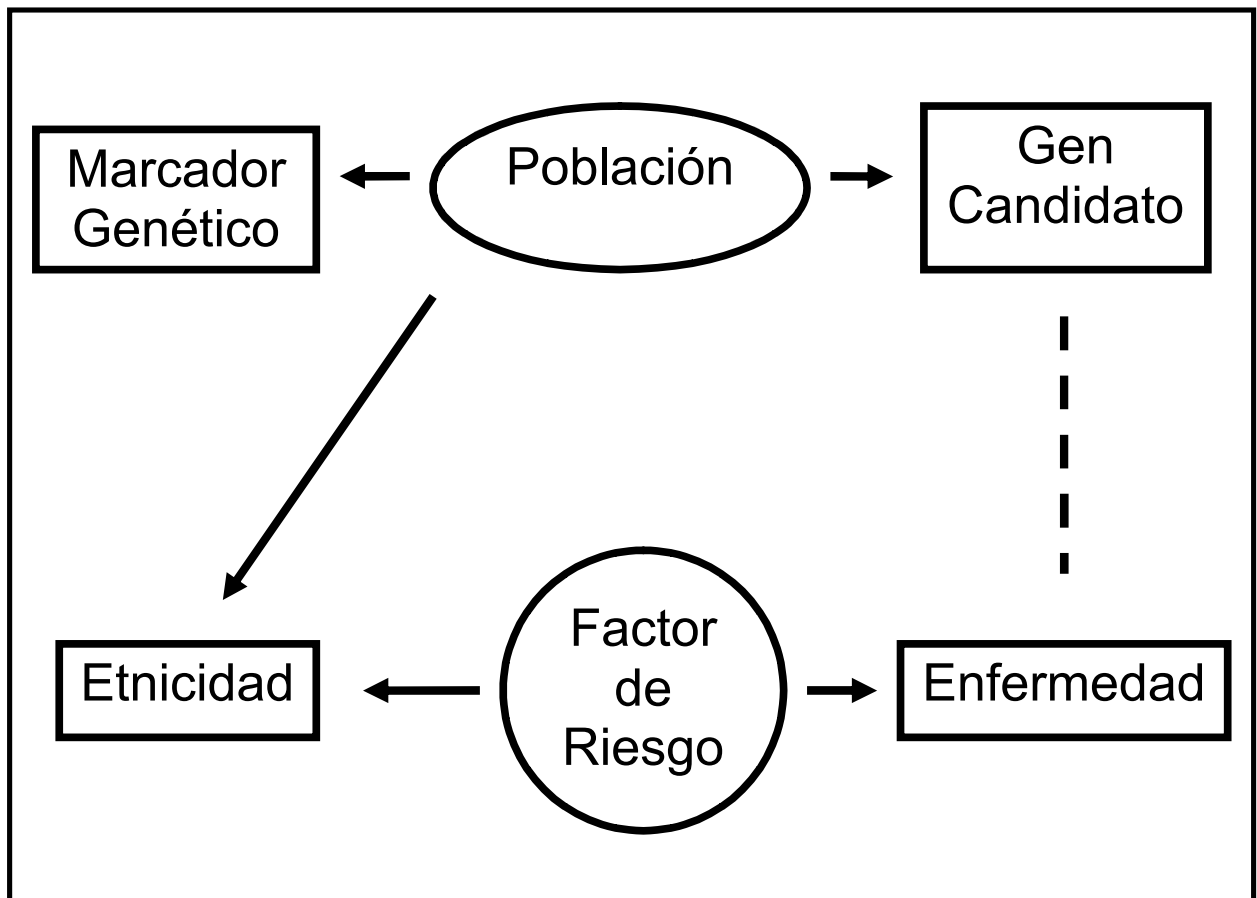


Figura 7. Modelo conceptual para la estratificación poblacional. Cuando se desea probar la asociación entre un gen candidato y la enfermedad se dice que está presente la etnicidad porque la frecuencia del gen está determinada por la población, determinada por factores de riesgo no cuantificables, mientras que el marcador genético puede ser determinada por la etnicidad.

2.5.7 Estudios de Asociación Basados en Familias

Otro tipo de estudios comúnmente utilizados son los estudios de asociación basados en familias, los cuales son una alternativa a los estudios de asociación casos-controles. Un método clásico de este tipo de estudios es el desarrollado por Spielman y cols., (1993) llamado prueba de transmisión de desequilibrio (TDT). Este tipo de estudios de asociación basados en familias incluyen padre, madre y probando, este tipo de estudio analiza la transmisión de alelos de los padres heterocigotos a los probandos y los compara con los alelos no transmitidos.

Una de las principales bondades de esta metodología es que evita problemas de estratificación poblacional. Utilizando esta metodología diversos estudios realizados en múltiples marcadores genéticos han reportado asociación con esquizofrenia [55, 60-62]. (Figura 8). Sin embargo, esta metodología puede presentar una elevada valor de los falsos positivos principalmente cuando esta en presencia de un elevado desequilibrio de ligamiento [63].

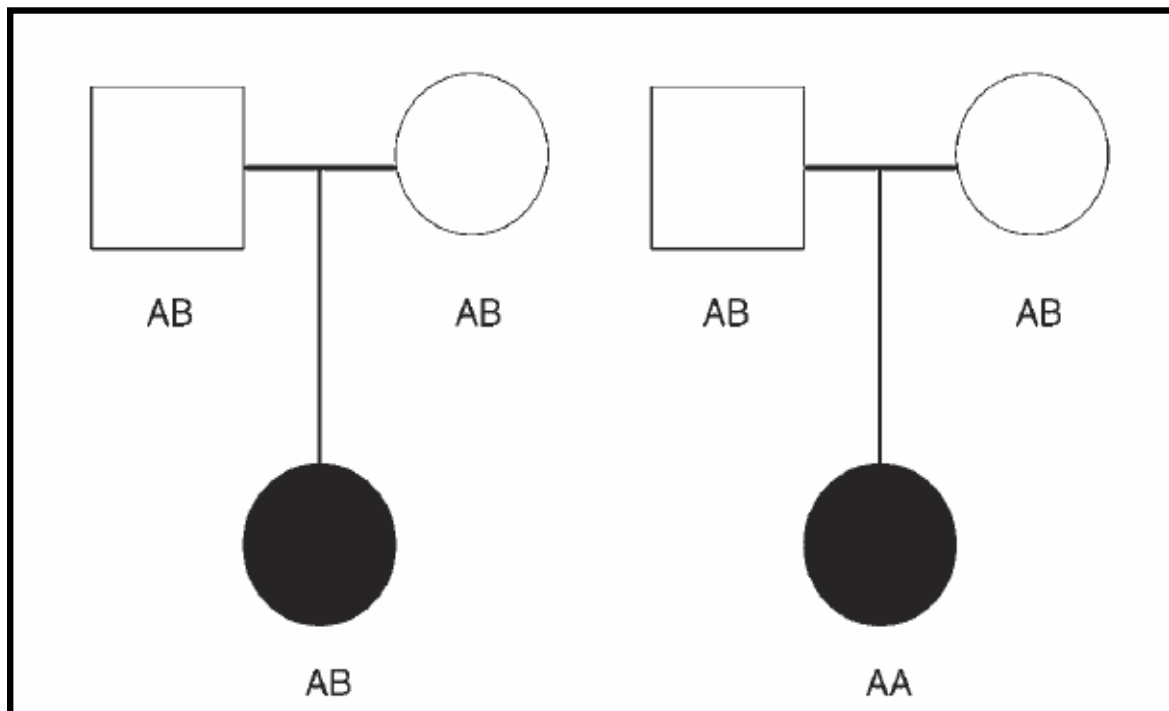


Figura 8. Prueba de Transmisión de desequilibrio. En este ejemplo los pares de letras bajo cada individuo es el genotipo de un marcador, se observa que en la prueba de transmisión de desequilibrio se calcula el número de alelos transmitidos de los padres heterocigotos a los probandos bajo la hipótesis que la frecuencia del alelo A es de 0.5 (Adaptada de Gordon 2005).

2.5.8 Asociación en Presencia de Ligamiento

Cuando mediante estudios de ligamiento se ha observado un ligamiento fuerte ($\text{LOD} \geq 3$) o sugestivo ($\text{LOD} > 2$ y < 3) a una región específica, entonces es necesario abundar en estudios que nos den más información sobre los genes que están en asociación en esa región. Para estos casos la metodología de asociación en presencia de ligamiento es ideal para probar el ligamiento de esa región al igual y al mismo tiempo que se prueba una asociación.

La metodología de asociación en presencia de ligamiento utiliza familias nucleares con por lo menos dos hermanos afectados (el TDT utiliza un hermano afectado). El utilizar esta metodología ofrece más información y menos error ya que no toma las transmisiones de padres a hijos de manera independiente como el TDT, sino que las analiza en su conjunto en las familiares nucleares, por lo que no aumenta el error de falsa asociación (falsos positivos) y al analizar a varios descendientes con la enfermedad puede analizar el ligamiento de la región con la enfermedad. Una de las principales ventajas de este tipo de estudios es que eleva el poder del estudio y que el método infiere los genotipos perdidos en los padres de los afectados. Sin embargo, por la complejidad del análisis y la dificultad para obtener familias con múltiples afectados son pocos los estudios que han utilizado esta metodología [58, 62, 64].

2.6 GENES CANDIDATOS

La elección de un gen candidato es muy importante en el desarrollo de los estudios de casos-contróles, existen dos maneras de identificarlos. La primera es tomando en cuenta su posición en una área cromosómica que previamente se ha reportado mediante estudios de ligamiento, tomando como hipótesis que los genes cercanos a las regiones que presentan mayor ligamiento pueden estar asociados con el desarrollo de la enfermedad [50, 65]. Una segunda manera de escoger un gen candidato es con base en la evidencia de que el gen participa en la fisiopatología de la enfermedad, o del fenotipo estudiado.

Uno de los grupos de genes más investigados son los genes involucrados en la vía dopaminérgica [66, 67]. El estudio de estos genes se basa en la teoría que los fármacos antipsicóticos son antagonistas a los receptores dopaminérgicos y que al ser administrados a los pacientes se observa una disminución de los síntomas de la esquizofrenia en dichos pacientes [66]. En este sentido, la literatura reporta que el gen de la COMT puede estar asociado con enfermedades complejas, una de ellas es el desorden bipolar; en esta enfermedad se han reportado estudios en los que se observa que, los pacientes portadores del alelo Met158, presentan con mayor frecuencia del ciclaje de la enfermedad respecto a los pacientes que son portadores de al menos una copia del alelo val [68, 69], estos resultados se han confirmado en otros estudios aunque existen publicaciones que reportan la pérdida de asociación de COMT y desorden bipolar [70].

Otra enfermedad en la que se ha asociado COMT es la anorexia nerviosa. Uno de los principales estudios es el realizado por Frisch y col., [71] en el que reportó que en 51 familias de la población Israelí se presenta una mayor transmisión del Alelo Val, pues la probabilidad (p) fue estadísticamente significativa ($p=0.023$). Aunque en otros reportes no se ha observado asociación. Los genotipos de COMT se han asociado también con el desorden obsesivo compulsivo [72] y con el déficit de atención e hiperactividad [73]. Con base en lo anterior, se ha propuesto que COMT podría estar asociada con enfermedades psiquiátricas y en especial con esquizofrenia.

Otro grupo de genes ampliamente estudiados son los genes relacionados a la vía serotoninérgica en especial a los receptores a serotonina (5-HT_{2A}). Los genes de esta vía son candidatos ya que al administrar fármacos de tipo antipsicóticos, a los

pacientes con esquizofrenia, se ha observado, que disminuyen el número de receptores a 5-HT_{2A} en la corteza prefrontal [74, 75], y que sus variaciones alélicas podrían estar asociada con mayor gravedad de los síntomas positivos [65, 76]. Dentro de esta vía, se le ha prestado especial interés a los genes que están involucrados en la síntesis de la serotonina [77] y a los que participan en la degradación de la dopamina [78].

Otro sistema donde se ha observado alteraciones asociadas con la esquizofrenia es el sistema glutamatergico. Se ha observado que los pacientes con esquizofrenia presentan una disminución en el número de receptores de tipo no-N-metil-D-aspartato (no-NMDA) así como una pérdida de estos receptores a glutamato en la región del lóbulo temporal [79, 80].

A la fecha en la literatura existen reportes de por lo menos 500 genes candidatos con asociación positiva o negativa para la esquizofrenia, que nos muestra lo complejo que es poder encontrar los genes etiológicos de la enfermedad. Un resumen con ejemplos de genes candidatos que se han asociado con esquizofrenia se presentan en la tabla 2, aunque estos estudios son muy numerosos, la falta de reproducibilidad de los resultados no permite el asociar de manera consistente un gen con la esquizofrenia. Debido a esto, en el estudio de los genes causantes de las enfermedades complejas se ha propuesto la asociación con características de la enfermedad es decir: características clínicas, mediciones bioquímicas o de función cerebral, que permitan una definición más homogénea de las diversas presentaciones de la enfermedad a estudiar en este caso la esquizofrenia, es importante poder establecer la asociación con la gravedad de los síntomas positivos, la gravedad de los síntomas negativos, la

edad de inicio de la enfermedad, la duración de la psicosis no tratada, el número de hospitalizaciones de los pacientes y de manera muy importante el estado cognitivo de los pacientes.

Tabla 2. Ejemplos de estudios de asociación de genes candidatos y esquizofrenia. Algunos estudios de asociación de tipo casos-contróles estudiados en esquizofrenia.

Tipo de Estudio	Gen/Marcador	Resultados	Referencia
170 casos-120 controles	D2, Ser311Cys	No asociación	Kaneshima y cols., 1997 [81]
50 casos-50 controles-100 familiares (TDT)	D2, Taq IBI/B2, Taq A1/A2	Ligamiento entre B2/A2 haplotipo y esquizofrenia	Dubertret y cols., 2001 [82]
311 casos-306 controles	D3, Ser9Gly	Exceso of homocigotos	Daniel y cols., 1996 [39]
97 casos-pareados	D5, microsatelites	Exceso de alelo 4 (40pb) en pacientes	Williams y cols., 1997 [66]
Caso-control	5HT21, T102C	No asociación	Gothert y cols., 1998 [75]
Caso-control	5-HT2A, AG-A	No asociación	Dracheva y cols., 2001 [80]
Caso-control	NMDA, mGluR2	Asociación	Daniels y cols., 1996 [39]
Caso-control	NMDA, GluR5	Asociación	Devon y cols., 1997 [83]

3 ANTECEDENTES PARTICULARES DEL TEMA

3.1 *ApoE*

La participación de la ApoE en la enfermedad de Alzheimer (EA) se estableció por la localización de depósitos amiloides y de ovillos neurofibrilares en el cerebro de los pacientes. Cuando se buscó la asociación del gen de la ApoE y la EA, se encontró una mayor frecuencia del alelo $\epsilon 4$ del gen de la ApoE en los pacientes con EA que en el grupo control; posteriormente, estos resultados fueron confirmados en distintas poblaciones [84]. Tras este hallazgo, se exploró la participación del alelo $\epsilon 4$ de ApoE en otras enfermedades que clínicamente presentan deterioro cognitivo, como la demencia no senil y la enfermedad de Parkinson y se observó que los portadores del alelo $\epsilon 4$ de ApoE, presentan mayor riesgo de padecer la enfermedad así como un inicio más temprano [85].

Otra probable participación del alelo $\epsilon 4$ de ApoE en los desórdenes neurológicos es la asociación con la demencia del cuerpo de Lewy (DCL) [86]. Clínicamente la DCL se caracteriza por un progresivo y fluctuante daño en las funciones cognitivas, parkinsonismo y la presencia de delirios y alucinaciones. Otras asociaciones positivas del alelo $\epsilon 4$ de ApoE y desórdenes neuro-psiquiátricos son: Síndrome de Down [87], holoprosencefalia de Creutzfeldt-Jakob [88] y en la enfermedad de Pick [89].

Como se puede observar, son diversas las asociaciones del gen de ApoE con enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas, por lo que se propuso que este gen podría estar participando en el desarrollo de la esquizofrenia [90, 91].

El gen de la ApoE se encuentra localizado en la región cromosómica 19q13.2 y está compuesto de cuatro regiones codificantes (exones), y tres no codificantes (intrones). Uno de los cambios de aminoácidos en ApoE es el caracterizado por el cambio de una base (*Single Nucleotide Polymorphism*) en las posiciones 334 y 472; las combinaciones 334T/472T, 334T/472C y 334C/472C constituyen los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, y $\epsilon 4$, respectivamente de ApoE y de estos resultan seis posibles genotipos, $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ [24].

Es muy importante poder conocer el desarrollo de los estudios del gen de la ApoE y la esquizofrenia para poder comprender mejor la importancia de abundar en el estudio de este gen y su relación con la esquizofrenia.

La literatura reporta que existe asociación de los polimorfismos de ApoE y esquizofrenia [92-94], sin embargo, la mayoría de estos trabajos no reportan asociación [64, 95-99]. En 1995 Harrington y cols., [90] fueron los primeros en reportar la asociación positiva de ApoE y esquizofrenia, ellos analizaron 42 pacientes con esquizofrenia, 165 pacientes con EA y 131 controles, todos ellos de origen caucásico y observaron una mayor frecuencia del alelo $\epsilon 4$ de ApoE en pacientes con esquizofrenia (26.2%) que en el grupo control (14.7%). Estudios posteriores no confirmaron estos resultados, como el reportado por Joobber y cols., (1996) en el cual no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas de los pacientes con esquizofrenia (16%) y el grupo control (20%).

Una limitante de estos primeros estudios fue el pequeño tamaño de muestra empleada (tabla 3), sin embargo, en estudios posteriores se aumentó el tamaño de muestra, como el reporte de Zhu y cols., (2007) que incluyeron 98 probandos y

98 controles (pareados), ellos no observaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas entre probandos y controles ($p=0.863$). Estos estudios, no sólo asociaron las frecuencias de los genotipos de ApoE con esquizofrenia, sino que también investigaron su relación con las características clínicas de la enfermedad. Arnold y cols., (1997) fueron los primeros en observar asociación de ApoE y una edad de inicio más temprana de la esquizofrenia en los pacientes portadores del alelo $\epsilon 4$ ($p=0.005$); al realizar una correlación de los genotipos de ApoE se observó que los pacientes portadores del genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ presentaban una edad de inicio más temprana que los pacientes portadores de otros genotipos ($r=-0.26$, $p=0.01$). En su muestra incluyeron 106 probandos de los cuales el 71% eran de origen caucásico y el 29% de origen afri-americano, 93 controles con el 60% de población de origen caucásico y el 40% de origen afri-americano. Sin embargo, Kimura y cols, (1997^a) no confirmaron los resultados de Arnolds y cols., ellos observaron la frecuencia de ApoE $\epsilon 4$ en 122 pacientes y 126 controles y no observaron asociación de ApoE $\epsilon 4$ con el inicio temprano de la enfermedad, sin embargo, observaron que en el grupo de pacientes la frecuencia más baja correspondía al alelo $\epsilon 2$, lo cual sugiere, que el alelo $\epsilon 2$ puede estar participando como un alelo protector y que los pacientes portadores de este alelo podrían tener un inicio más tardío de la enfermedad que los pacientes con los alelos $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$.

Debido a la falta de reproducibilidad en los resultados Town y cols., (1997) realizaron un análisis en el que sumaron las frecuencias de los estudios publicados previamente, con la finalidad de aumentar el poder. El poder de un estudio se describe como la capacidad de una prueba estadística para detectar

una asociación o diferencias significativa para decir qué tan ciertos pueden ser tomados sus resultados y representa la probabilidad de rechazar la hipótesis nula de un estudio cuando es falsa. Ellos lograron un poder en su trabajo de 0.93, sin embargo no observaron asociación de ningún alelo de ApoE con esquizofrenia ($\chi^2=0.376$, $p=0.54$). Por lo tanto, se puede observar lo controversial del papel de ApoE y la esquizofrenia.

Por otro lado Igata-Yi y cols., (1997) en una muestra con 230 pacientes esquizofrénicos y 130 controles, observaron mayor frecuencia del alelo $\epsilon 3$ en el grupo de casos (77.6%) respecto al grupo control (56.2%) [97], estos resultados aumentaron la discusión respecto a la participación del gen de la ApoE en la esquizofrenia, pues los reportes únicamente habían presentado asociación de alelo ApoE $\epsilon 4$ y este estudio introduce la hipótesis que el alelo de riesgo para esquizofrenia podría ser el alelo $\epsilon 3$, por lo que es necesario el poder abundar en el estudio del tema.

Dada la falta de asociación de ApoE $\epsilon 4$ con la esquizofrenia, se propuso que podría estar asociada al género. Martorell y cols., (2001) fueron los primeros que reportaron diferencias por género, cabe mencionar que este estudio fue realizado en población caucásica [100]. Ellos observaron que ApoE $\epsilon 4$ no es un factor de riesgo para la esquizofrenia cuando analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas de 365 casos y 584 controles, sin embargo, al analizar la muestra de acuerdo al género sí observaron una asociación de ApoE $\epsilon 4$ con inicio temprano de la esquizofrenia en mujeres ($p=0.001$), por lo que se sugiere que podría estar participando de manera género-dependiente [100]. Apoyando esta hipótesis existen reportes que han observado que las mujeres que portan el alelo $\epsilon 4$ de

ApoE, tienen un curso de la enfermedad más grave que las mujeres no portadoras de esta variante genética. Otro reporte observó asociación entre el genotipo $\epsilon 2/\epsilon 3$ de ApoE y hombres [94]. Estos hallazgos permiten observar que podría haber una relación género dependiente con la enfermedad y con la gravedad clínica de la esquizofrenia.

Otro tipo de hipótesis de asociación del gen ApoE y esquizofrenia se ha dirigido a probar cómo podría el medio ambiente ser un predictor hacia el desarrollo de la esquizofrenia, en este sentido, existe un reporte en la literatura publicado por Liu y cols., en 2003. Este interesante trabajo reportó el mayor tamaño de muestra publicado a la fecha al incluir en su estudio 579 casos y 1528 controles, ellos encontraron una asociación de ApoE $\epsilon 4$ y esquizofrenia ($p \leq 0.0001$), sin embargo, observaron que esta puede relacionarse a la fecha de nacimiento de los pacientes puesto que el grupo que presentaba la asociación presentaba en promedio una edad similar. Al analizar la fecha de nacimiento observaron que correspondía a periodos de malnutrición en la población china, lo cual sugiere que, en esa población ApoE podría estar asociado con la esquizofrenia en pacientes con malnutrición pre y pos-natal [101]. Estos resultados abren la posibilidad de estudiar características asociadas con factores medioambientales.

Otro hallazgo que aporta importancia al estudio del gen de la ApoE y esquizofrenia es el reportado por Kampman y cols., (2004). Ellos reportaron pérdida de la asociación de ApoE $\epsilon 4$ y esquizofrenia en población asiática, sin embargo, sugieren que ApoE $\epsilon 3$ podría estar asociada con la enfermedad y con el inicio temprano del padecimiento. En el estudio se reportó, que los pacientes portadores de ApoE $\epsilon 3$ presentan una tendencia de asociación con la edad de inicio ($p=0.04$),

sin embargo, al subdividir la muestra se crearon grupos muy pequeños, por lo que es necesario, realizar este tipo de estudios pero con tamaños de muestras más grandes. Con base en lo anterior, la participación de ApoE y esquizofrenia, es controversial, dada la falta de reproducibilidad en los resultados

Por último, en la literatura hay datos que apoyan la hipótesis de que el alelo $\epsilon 4$ de ApoE puede modular las características clínicas de los pacientes con esquizofrenia como son: déficit cognitivo, síntomas positivos y síntomas negativos [93] sin embargo, son pocos los estudios publicados a la fecha que evalúan el déficit cognitivo en pacientes esquizofrénicos [93, 96] y respecto a los síntomas positivos y los síntomas negativos pocos trabajos han estudiado la asociación de ApoE y la severidad de estos, a este respecto en la literatura solo existe un reporte por Pickar y cols., (1997), sin embargo, no observaron diferencias estadísticamente significativas entre la gravedad de los síntomas de los pacientes portadores del alelo ApoE $\epsilon 4$ y los no portadores de este alelo [102].

Como su puede observar, existe discrepancia en los resultados publicados a la fecha, por lo que se ha propuesto algunas posibles explicaciones, una de ellas es la diferencia en el tamaño de muestra en los estudios, ya que se observa que varía en los diversos trabajos publicados. Los primeros reportes que presentan asociación positiva de la ApoE $\epsilon 4$ y esquizofrenia tienen un tamaño de muestra pequeño ($n < 50$). Por lo que es necesario, que los estudios futuros se realicen con tamaños de muestras grandes para reducir los falsos positivos y mediante el uso de metodologías que aporten más información como son los estudios de asociación basados en familias y en especial los estudios de asociación en presencia de ligamiento.

Tabla 3. Estudios de asociación de tipo casos-contróles ApoE y esquizofrenia reportados.

Criterio Diagnóstico	Resultado de Asociación con ApoE	(n)		Referencias
		SQZ*	Control	
DSM-III-R	Positiva	93	106	Arnold y cols., 1997 [93].
DSM-IV	Positiva	94	98	Kampman y cols., 2004 [24].
DSM-IV	Positiva	579	1528	Liu y cols., 2003 [101].
ICD-9	Positiva	365	584	Martorell y cols., 2001 [100].
No especificado	Positiva	42	131	Harrington y cols., 1995 [90].
DSM-IV	Negativa	237	137	Chen y cols., 1999 [103].
ICD-10	Negativa	114	94	Durany y cols., 2000 [92].
DSM-III-R	Negativa	40	57	Lodoso y cols., 2006 [95].
DSM-IV	Negativa	54	33	Igata-Yi y cols., 1997 [97].
No especificado	Negativa	51	35	Joobar y cols., 1996 [96].
DSM-III-R	Negativa	122	126	Kimura y cols., 1997 [97].
DSM-IV	Negativa	314	118	Kimura y cols., 2000 [97].
DSM-IV	Negativa	60	60	Han y cols., 2006 [104].
DSM-IV	Negativa	28	26	Moberg y cols., 2006 [105].
DSM-IV	Negativa	106	250	Saiz y cols., 2002 [106].
DSM-IV	Negativa	114	91	Schurhoff y cols., 2003 [94].
DSM-III-R	Negativa	69	121	Sorbi., y cols., 1998 [99].
DMS-III-R	Negativa	45	98	Thibaut y cols., 1999 [107].
DSM-IV	Negativa	62	63	Hennah y cols., 2007 [64].
DSM-IV	Negativa	60	42	Tovilla-zarate y cols., 2008 [108].
DSM-III-R	Negativa	63	301	Town y cols., 1997 [98].
DSM-III-R	Negativa	98	98	Zhu y cols., 2007 [55].

* Esquizofrenia

3.2 COMT

La catecol-O-metiltransferasa (COMT) es la principal enzima que participa en la degradación de la dopamina, y se ha observado que alrededor del 60% de la dopamina liberada es degradada por la COMT a nivel de la corteza frontal [109]. Por lo tanto, se propone que factores genéticos podrían estar participando en el funcionamiento de la COMT y en la degradación dopaminérgica y de esta manera afectar el funcionamiento cognitivo [65, 110, 111].

El gen de la COMT se encuentra localizado en el cromosoma 22q11.21 (acceso en GenBank Núm. Z26491) y está compuesto por 6 exones y 5 intrones. Este gen es polimórfico, uno de los principales polimorfismos es el que se encuentra localizado en la posición 472 del exón 4 (rs4680) el cambio de G por A, el cual es funcional pues determina la sustitución de aminoácidos presentando Valina (Val) ó Metionina (Met) en el codón 158.

La actividad enzimática de COMT es genéticamente polimórfica porque tiene alta actividad enzimática cuando se presenta el genotipo Val158/Val, actividad intermedia cuando lleva el genotipo Val158/Met y baja actividad cuando está presente el genotipo Met158/Met [63, 112, 113].

Tabla 4. Principales estudios de asociación casos-control de COMT y esquizofrenia.

Año	Número de alelos Val		Odds Ratio	IC	Autor
	Casos	Control			
2001	209	60	1.2	0.8-1.9	Egan y cols., 2001 [59]
2002	116	96	1.3	0.9-1.9	Joober y cols., 2002 [114]
1999	143	127	1.3	0.9-1.8	De Chaldee y cols., 2001 [115]
2002	333	306	1.1	0.9-1.4	Norton y cols., 2002 [116]
2002	150	165	0.7	0.4-1.1	Park y cols., 2006 [104]
2001	411	416	1.0	0.8-1.2	Arinami y cols., 2001 [117]
1999	254	244	1.0	0.6-1.4	Chen y cols., 1999 [118]
1996	76	73	1.1	0.7-1.7	Daniels y cols., 1996 [39]
2001	104	55	0.9	0.6-1.4	Erken y cols., 2001 [78]
1998	162	132	1.0	0.7-1.7	Larayiorgou y cols., 1998 [119]
1999	84	454	1.7	0.5-1.0	Kotler y cols., 1999 [120]
2001	304	275	1.2	0.7-1.4	Liu y cols., 2001 [121]
1998	193	218	1.7	0.5-1.0	Ohmori y cols., 1998 [122]
1997	52	104	1.6	0.4-1.0	Strous y cols., 1997 [123]

Li y cols en 1996 [101] fueron los primeros en demostrar asociación entre el alelo Val158 y esquizofrenia, desde entonces muchos estudios se han desarrollado intentando reproducir sus hallazgos aunque los resultados son inconsistentes [122]. En la tabla 4 se enumera los principales estudios de asociación de COMT y esquizofrenia.

El deterioro cognitivo asociado a la corteza prefrontal es característico de los pacientes con esquizofrenia, sin embargo, la asociación de COMT y esquizofrenia se estableció cuando Egan y cols., (2001) observaron que pacientes con esquizofrenia portadores del alelo Val, presentaban mayor deterioro cognitivo, principalmente en la memoria de trabajo. Este resultado se obtuvo al comparar las pruebas cognitivas en pacientes esquizofrénicos con sus hermanos no afectados y con un grupo control. Este hallazgo permitió formular la hipótesis que los pacientes portadores del alelo Val158, tienen mayor degradación dopaminérgica y por lo tanto hay menor presencia de dopamina en el espacio intersticial, lo cual podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de la esquizofrenia y su efecto en la memoria de trabajo [59]. Este resultado ha generado polémica en el sentido que pocos trabajos han observado esta asociación [55, 59, 124], y por el contrario, otros estudios han observado lo opuesto al reportar asociación pero del alelo Met158 y esquizofrenia [120, 122], y la mayoría de las publicaciones a la fecha no observan diferencias estadísticamente significativas al analizar los alelos de COMT con esquizofrenia [39, 78, 104, 114-119, 121, 123, 125-131]. Esta falta de reproducibilidad no permite observar cual es el papel del polimorfismo Val158Met de COMT y esquizofrenia. En la literatura se sugiere que la estratificación poblacional, el tamaño de muestra y los criterios diagnósticos que definen a la muestra, contribuyen a la falta de reproducibilidad en los estudios de asociación. Por otro lado los estudios de meta-análisis permiten analizar datos obtenidos de diversos estudios con tamaños de muestra pequeños y con bajo poder estadístico analizando los resultados como un todo para poder tener la tendencia e los resultados en general, utilizando esta metodología un reciente trabajo fue el

publicado por Wang y cols., (2007), ellos no observaron asociación de COMT (OR=1.09, IC=0.94-1.26) y esquizofrenia, sin embargo, sus resultados presentaban heterogeneidad en sus muestras, para poder eliminar el sesgo en sus resultados fue necesario analizar la muestra por grupos más homogéneos como la etnicidad, al realizar la estratificación el resultado general siguió conservándose al no observar asociación de COMT y esquizofrenia en población asiática (OR=0.96, IC=0.85-1.09), ni en población europea (OR=1.06, IC=0.95-1.19). Estos resultados están acordes con lo reportado previamente[91], sin embargo, cuando Glatt y cols., (2003) realizaron un análisis en familias, ellos observaron una mayor transmisión del alelo Met158 en esquizofrenia, por lo tanto, con base en los resultado meta-analíticos expuestos se puede observar que existe controversia en la literatura acerca del papel de COMT en esquizofrenia.

Por otro lado, al analizar el deterioro cognitivo en pacientes con esquizofrenia y el gen COMT, la literatura presenta hallazgos relevantes, como el obtenido por Hyun-Han y cols., (2006), al analizar una muestra de 132 casos y 80 controles, observaron asociación del alelo Met158 y la mayor gravedad del deterioro cognitivo (atención $p=0.002$), y al medir los síntomas positivos observaron mayor gravedad de los delirios en los portadores del alelo Met158 ($p=0.009$). Los autores sugieren que los pacientes portadores del alelo Met158 presentan mayor severidad del deterioro cognitivo [104]. Estos datos son apoyados por estudios de neuroimagen en los que se observa que los pacientes portadores del alelo Val158 de COMT presentan un mejor funcionamiento en la prueba de memoria de trabajo [132]. Sin embargo, dichos resultados difieren de lo reportado por Egan y cols., (2001) que observaron que son los pacientes portadores del alelo Val158 los que

presentan mayor deterioro cognitivo [59]. Por su parte, Zhao y cols., (2006) observaron en una muestra de 132 probandos que los pacientes portadores del alelo Val158 presentaban mayor deterioro cognitivo, sin embargo, en una muestra de 117 pacientes con esquizofrenia [133] no se reprodujo este hallazgo y tampoco observaron diferencia al realizar análisis de acuerdo al género. Por otro lado, pocos son los reportes que analizan la severidad de la esquizofrenia utilizando como parámetro el número de hospitalizaciones de los pacientes, estudios como el de Herken y cols., (2001) no observan diferencias estadísticamente significativas entre los probandos al correlacionar los genotipos de Val158Met de COMT con el número de hospitalizaciones [78].

Con base en la evidencia presentada anteriormente es necesario abundar en estudios que permitan observar cuál es el papel de COMT no sólo en asociación con la esquizofrenia, sino además, determinar en el estudio si existe asociación con las características clínicas, como son la gravedad de los síntomas positivos, severidad de los síntomas negativos, edad de inicio de la enfermedad y el deterioro cognitivo utilizando metodologías y en especial estudiar la asociación basada en familias como es la asociación en presencia de ligamiento

4 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO GENÉTICO DE LA ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia es un desorden psiquiátrico que afecta alrededor del 1% de la población mundial y caracterizado por presentar síntomas positivos, síntomas negativos y deterioro cognitivo [7]. Estudios de gemelos, de adopción y de familias presentan evidencias de la existencia de un componente genético en la etiología de la enfermedad, sin embargo, al buscar mediante estudios de ligamiento y asociación los genes que pudieran estar participando en la etiología, son pocas las evidencias de regiones y genes que podrían estar relacionados con el desarrollo de la esquizofrenia. Por lo cual, la búsqueda de genes candidatos para el desarrollo de la esquizofrenia se ha centrado en genes que quizá están relacionados con alguna dimensión de la enfermedad ó características clínicas de la esquizofrenia como es la gravedad de los síntomas positivos y negativos [50].

Uno de los genes más estudiados es el gen de la ApoE, de manera frecuente a este gen se la asocia con susceptibilidad al desarrollo y el inicio temprano de la enfermedad de Alzheimer [134]. El deterioro cognitivo visto en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer es muy similar al que se observa en los pacientes con esquizofrenia lo que llevo a postular la hipótesis de que ApoE podría estar participando en la etiología de la esquizofrenia. El primer estudio en el que se observó la asociación de ApoE y esquizofrenia fue el publicado en 1995. [90], ellos observaron una mayor frecuencia del alelo $\epsilon 4$ de ApoE en los probandos que en el grupo control, a partir de ahí se han publicado muchos estudios de asociación, sin

embargo, dada la falta de reproducibilidad en los resultados es necesario abundar en el estudio para analizar la participación de ApoE en la esquizofrenia [69].

La mayoría de los estudios reportados a la fecha son del tipo casos-contróles, este tipo de estudios permite observar si un alelo está asociado o no con la enfermedad, sin embargo, presentan algunas limitaciones, como la necesidad de grandes tamaños de muestra, y la estratificación poblacional, por lo que es necesario utilizar metodologías, que ayuden a reducir el error y que nos permitan aumentar el poder en la muestra. Uno de los estudios propuestos para superar estas limitaciones es el estudio en pares de hermanos afectados.

Otro gen implicado en el deterioro cognitivo observado en la esquizofrenia es el gen de la COMT [37]. La COMT participa en la vía de degradación de la dopamina. Uno de los polimorfismos más estudiados en este gen es el polimorfismo Val158Met y se ha propuesto que los pacientes portadores del alelo Val158 de COMT presentan mayor deterioro cognitivo que los que portan el alelo Met158, sin embargo, reportes posteriores han observado un comportamiento opuesto, por lo que es necesario abundar en el estudio del papel de COMT en la esquizofrenia [59].

Por otro lado los estudios reportados a la fecha en los que se analiza el papel de ApoE y COMT con esquizofrenia fueron realizados principalmente en población caucásica y asiática y no se encuentra en la literatura ningún estudio realizado con población mexicana. A pesar de la diversidad poblacional, recientes estudios proponen a población mexicana homogénea [127, 135], por lo que la realización de pruebas de asociación en este tipo de población reduce la estratificación poblacional y aumenta el poder del estudio, utilizando esta característica nosotros

utilizamos diversas metodologías de estudios de asociación para abundar en la investigación del papel de los genes COMT y ApoE en la esquizofrenia.

En nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en donde no sólo se realizó un estudio de tipo casos-controles para el gen ApoE en población mexicana y esquizofrenia, sino además, se realizó un estudio meta-analítico con los resultados obtenidos en nuestro estudio de casos-controles y con los resultados previamente publicados, además, se analizaron las características clínicas de los pacientes y se asoció la severidad de la enfermedad con los genes ApoE y COTM, por último, se realizó el primer estudio de asociación basado en familias utilizando una muestra de pares de hermanos afectados para los genes ApoE y COMT.

5 OBJETIVOS

En este trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la frecuencia alélica de los genes ApoE y COMT y su relación con la esquizofrenia en familias mexicanas.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- **Determinar la asociación casos-control y meta-analítica del gen de la ApoE pacientes con esquizofrenia**
- **Determinar la asociación basada en familias del gen de la ApoE y esquizofrenia en familias con pares de hermanos afectados**
- **Asociar la edad de inicio, gravedad de los síntomas positivos y negativos de los pacientes con esquizofrenia que presenten el alelo ε4 del gen de la ApoE**
- **Determinar la asociación basada en familias del gen COMT y esquizofrenia en familias con pares de hermanos afectados**
- **Asociar la edad de inicio, gravedad de los síntomas positivos y negativos de los pacientes con esquizofrenia que presenten el alelo val158**

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

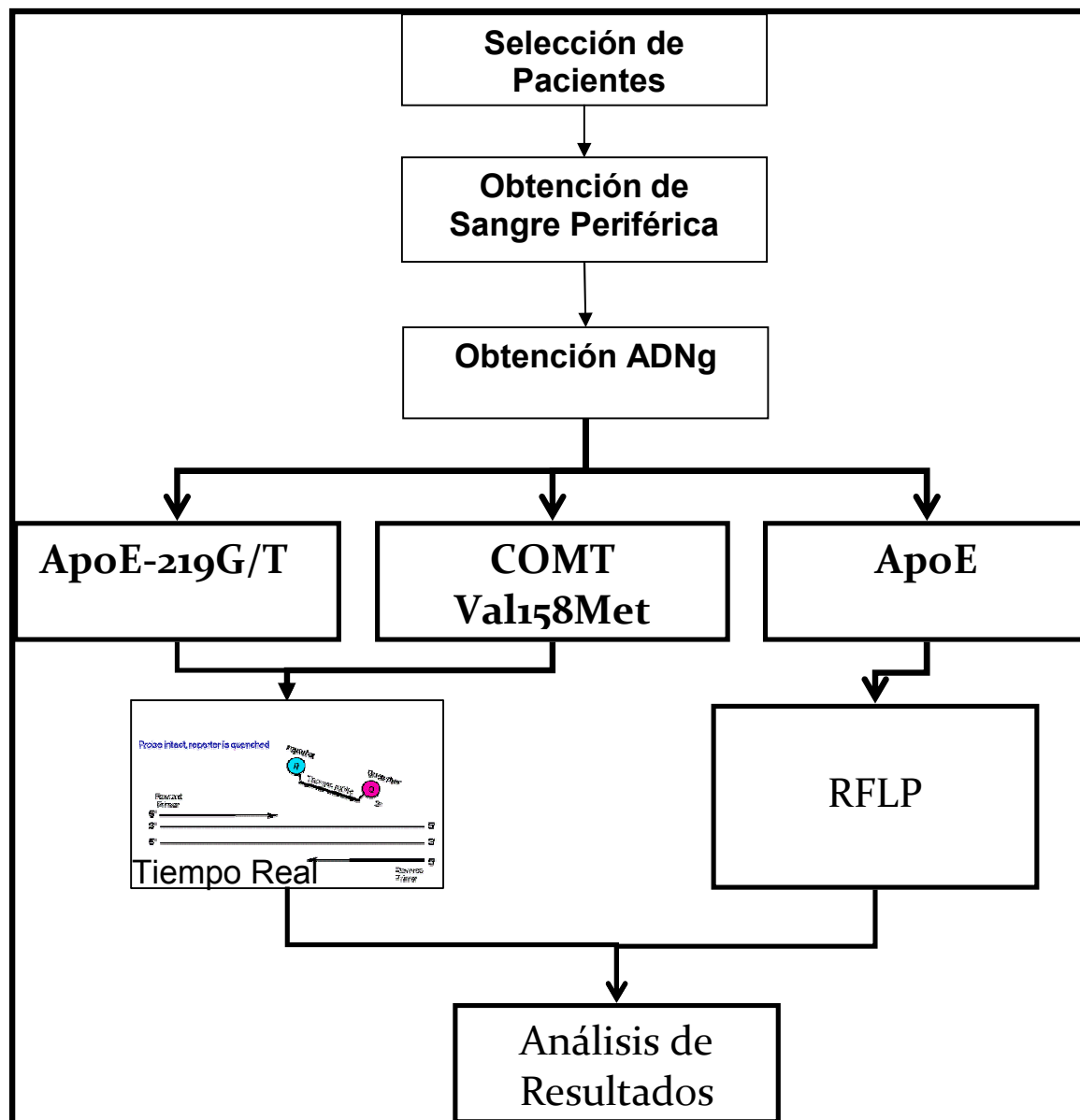


Figura 9. Estrategia experimental seguida en el estudio.

7 METODOLOGIA

7.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio prospectivo, transversal, y comparativo.

7.2 SUJETOS

Este estudio fue sometido y aprobado por el Comité de Ética y Científico del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente” y del Centro de Estudios Médicos Carracci. Participaron 60 familias con por lo menos un par de hermanos afectados, obtenidos de la consulta externa del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente y del Centro de Estudios Médicos y Familiares Carracci.

Todos los sujetos y los tutores para menores de edad firmaron un consentimiento informado de participar en el estudio después de que se les dio una explicación verbal y escrita de los objetivos de la investigación.

Para el estudio de casos-contróles únicamente se tomó al probando de cada familia para incluirse en el estudio, se incluyeron 42 individuos sanos, en quienes se descartó la presencia de cualquier trastorno psiquiátrico.

7.3 CRITERIOS DE INCLUSION

En este estudio los participantes cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- Edad entre 17 y 50 años
- Firma del consentimiento informado
- Hijos de padres y abuelos mexicanos
- Diagnostico de esquizofrenia (determinados por los criterios del DSM-IV).
- No comorbilidad con otro trastorno psiquiátrico

7.4 EVALUACIÓN CLINICA

La Escala de Evaluación de Síntomas Negativos (SANS) [136] y la Escala de Evaluación de Síntomas Positivos (SAPS) [137] se utilizaron para observar la presencia de los síntomas psicóticos. La escala SANS y la escala SAPS se encuentran entre los instrumentos más comúnmente usados para evaluar la gravedad de los síntomas en la esquizofrenia. La escala de SANS comprende 25 reactivos diseñados para evaluar cinco categorías: 1) aplanamiento de la afectividad, 2) alogia, 3) abolición/apatía, 4) anhedonia, y 5) atención. La escala de SAPS tiene 30 reactivos agrupados en cuatro categorías: 1) alucinaciones, 2) delirios, 3) conducta bizarra, y 4) trastorno formal de pensamiento. Ambas escalas tiene una puntuación de 0 a 5, donde "0" denota la ausencia de un síntoma particular "y 5" es la forma más grave.

El estado cognitivo del paciente fue medido por el Mini Examen del Estado Mental (MMSE) [138], esta prueba contiene 30 reactivos diseñados para evaluar 5 categorías 1) orientación, 2) registro, 3) atención y cálculo, 4) memoria reciente y 5) lenguaje. En donde con 27 puntos o mas la persona es considerada con adecuada capacidad cognoscitiva, 24 puntos a 12 la persona es considerada con deterioro y 12 a 9 es considerada con demencia.

La edad de inicio de la enfermedad fue definida como la edad cronológica en la que los pacientes experimentaron síntomas positivos (alucinaciones y delirios) por primera vez (primer episodio psicótico); este parámetro fue obtenido por una entrevista clínica con el paciente y sus parientes [139]. Se considera inicio temprano de la esquizofrenia si el cuadro clínico hace eclosión antes de los 18 años de edad [97, 140].

La duración de la psicosis no tratada fue definida como el periodo de tiempo entre la aparición de los síntomas psicóticos y el inicio de un tratamiento especializado. Cada uno de los sujetos afectados que participaron en este estudio, fueron evaluados por un psiquiatra mediante la aplicación de la Entrevista de Diagnóstico para Estudios Genéticos (DIGS), validada al español [141]. Los datos obtenidos de las entrevistas fueron enviados a dos psiquiatras que no habían tenido contacto con los pacientes para su re-evaluación, este procedimiento es conocido como “el mejor evaluador”.

7.4 GENOTIPIFICACIÓN

En este estudio se genotipificaron tres polimorfismos: ApoE, ApoE-219G/T (rs405509), y COMT (rs4680).

7.5.1 Genotipificación de ApoE

Se extrajo una muestra de 10 ml de sangre de cada individuo. El DNA genómico se extrajo utilizando una versión modificada del protocolo de extracción rápida de Lahiri [142]. El genotipo del sistema polimórfico bajo estudio se realizó adaptando y amplificando los fragmento de restricción por el ensayo de reacción en cadena de polimerasa del polimorfismo reportado por Wenham [143]. Posteriormente 200 ng de DNA genómico se amplificó usando los primers específicos **5'-tcc aag gag ctg cag gcg gcg ca-3'** y **5'-aca gaa ttc gcc ccg gcc tgg tac act gcc-3'**. 10 µl de lo amplificado se incubó con 12 U de Cfol endonucleasa (Roche diagnostics). El volumen total de la digestión, fue electroforizada a 220-250 V en un gel de 20% de poliacrilamida y visualizada con 1 µl/ml bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. El genotipo fue realizado ciego al ensayo clínico.

7.5.2 Genotipificación de ApoE-219G/T (rs405509)

En la genotipificación de ApoE-219G/T el volumen final para la PCR fue de 5µL, se utilizaron 20 ng de DNA genómico, 2.5 µL de master mix TaqMan®, 0.125µL de ensayo hecho a orden a 20X. La amplificación fue realizada en placas de 96

pozos, usando el protocolo de TaqMan® PCR universal. Después de la PCR de punto final, la intensidad fue medida con el sistema PCR 7500 real time con el software SDS V2.1 (Applied Biosystems).

7.5.3 Genotipificación de COMT (rs4680)

Utilizamos el ensayo 5' nucleasa (TaqMan®) para distinguir los dos alelos del gen. La amplificación de PCR se realizó con 20ng de DNA, utilizando master mix universal TaqMan al 1X, 900 Nm del primer sentido y antisentido, 200 nM de la sonda FAM y 200 nM de la sonda VIC, para un volumen final de reacción de 5 µl. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 92°C por 15 segundos y 60° por un minuto. Al terminar la PCR de punto-final la intensidad de fluorescencia fue medida en el equipo PCR System con software SDS v2.1 (Applied Biosystems), la discriminación alélica identificó claramente los 3 genotipos de COMT (rs4680). Todos los genotipos fueron realizados a ciego al estatus de los pacientes. Como un control de calidad adicional se tomaron algunas muestras al azar y se repitió el genotipo.

7.6 ANALISIS ESTADÍSTICO

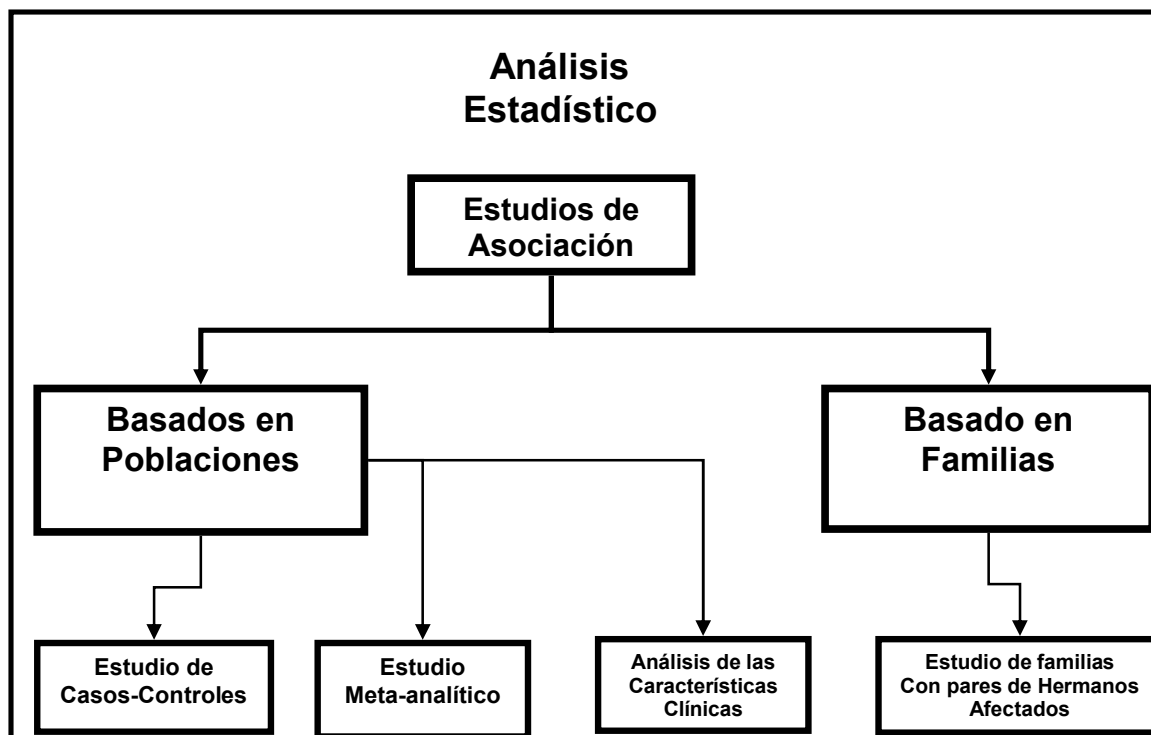


Figura 10. Análisis estadísticos empleados en el estudio. En es estudio se realizaron diversos análisis estadísticos de acuerdo al diseño de cada etapa del estudio.

7.6.1 Estudio de asociación basado en poblaciones

Para el estudio de casos-control (polimorfismo ApoE), la presencia del equilibrio de Hardy-Weinber se realizó mediante el programa FINETTI (Programa libre en <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Las diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas, entre casos y controles fueron comparadas mediante la prueba χ^2 . El análisis de estimación de significancia fue mediante el análisis 2-colas y se fijo

en $p \leq 0.05$. El análisis estadístico fue realizado usando el programa GraphPad Prism4.

Para el análisis de las características clínicas se realizaron comparaciones entre portadores y no portadores de alelo ApoE $\epsilon 4$ y del alelo val158 de COMT y la presencia de síntomas positivos, negativos y deterioro cognitivo. Se realizaron utilizando la prueba χ^2 y la prueba t de Student. Las comparaciones toman de manera independiente la presencia de los síntomas positivos, negativos, el deterioro cognitivo y la edad de inicio de la enfermedad.

Para el estudio meta-analítico, se realizó una búsqueda computarizada en Medline con el criterio: "*ApoE and Schizophrenia*". De la búsqueda bibliográfica, se incluyeron artículos con datos originales, que incluyeron estudios de asociación entre casos y controles del gen de la ApoE y esquizofrenia, en los que se pudiera establecer las frecuencias de genotipos y alelos para el cálculo del OR (*odds ratio*) y que el polimorfismo analizado fuera el localizado en el exón 4 del gen de la ApoE. Nuestro estudio de asociación casos-control se incluyó en el meta-análisis porque cumple con los criterios antes mencionados.

Los datos de cada uno de los estudios incluidos en el análisis fueron clasificados por fenotipo (pacientes con esquizofrenia y controles sanos) y por la presencia o ausencia de por lo menos un alelo $\epsilon 4$ de ApoE, considerado el alelo de riesgo. Los OR estiman la probabilidad de que el alelo de riesgo esté presente con mayor frecuencia en los casos comparados con los controles sanos [91]. Un OR superior a 1 sugiere una asociación positiva del alelo de riesgo y la esquizofrenia. Los resultados de cada uno de los estudios incluidos en el meta-análisis fueron expresados por el modelo de efectos aleatorios, para lo cual se calculó el OR para

cada estudio y se fijó el intervalo de confianza en un 95%. La significancia de los OR de todos los estudios fue determinada mediante la prueba Z. Se llevó a cabo una prueba de heterogeneidad entre los estudios seleccionados con el propósito de determinar si el tamaño del efecto proviene de una muestra homogénea. El meta-análisis fue realizado mediante el uso de los programas EPIDAT 3.1. (Organización Panamericana de la Salud, OPS/OMS), y Metanalysis [144] obteniendo el mismo resultado final.

7.6.2 Estudios de asociación basado en familias

Para determinar la concordancia alélica mediante el método idéntico por descendencia, se realizó un estudio de asociación en presencia de ligamiento en familias con pares de hermanos afectados.

La diferencia en frecuencias alélicas entre padres y hermanos afectados fue comparada y analizada por el paquete estadístico APL V.1.1 (el programa es libre en <http://www.chg.duke.edu/research/software.html>) [145]. Este programa analiza a familias nucleares y está basado en la diferencia entre el número observado de copias de un alelo específico en los hermanos afectados y el número esperado de este alelo basado en los genotipos de los padres analizando la probabilidad de padres afectados y no afectados, bajo la hipótesis nula de no ligamiento y no asociación.

Considerando que los polimorfismos estudiados pueden tener diferentes efectos en hombres y mujeres se realizaron pruebas por separado de acuerdo al género.

Para observar si el polimorfismo podría tener influencia sobre el inicio de la esquizofrenia, se agrupó a las familias con hermanos concordantes para el inicio

temprano de la enfermedad (≤ 18 años) y en familias con hermanos concordantes al inicio tardío de la enfermedad (≥ 18 años).

Los haplotipos fueron determinados utilizando el programa PHASE V.2.1.[146], del cual se obtuvo el haplotipo más probable en cada uno de los sujetos, y posteriormente fue analizado por el programa APL.

La corrección de Bonferroni fue aplicada para la asociación en presencia de ligamiento (el nivel de significancia estadística fue $\alpha \leq 0.05/2 = 0.025$

8 RESULTADOS

8.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

8.1.1 Características de las Familias

En este estudio participaron un total de 245 personas, el estatus familiar es agrupado como aparece en la figura 11.

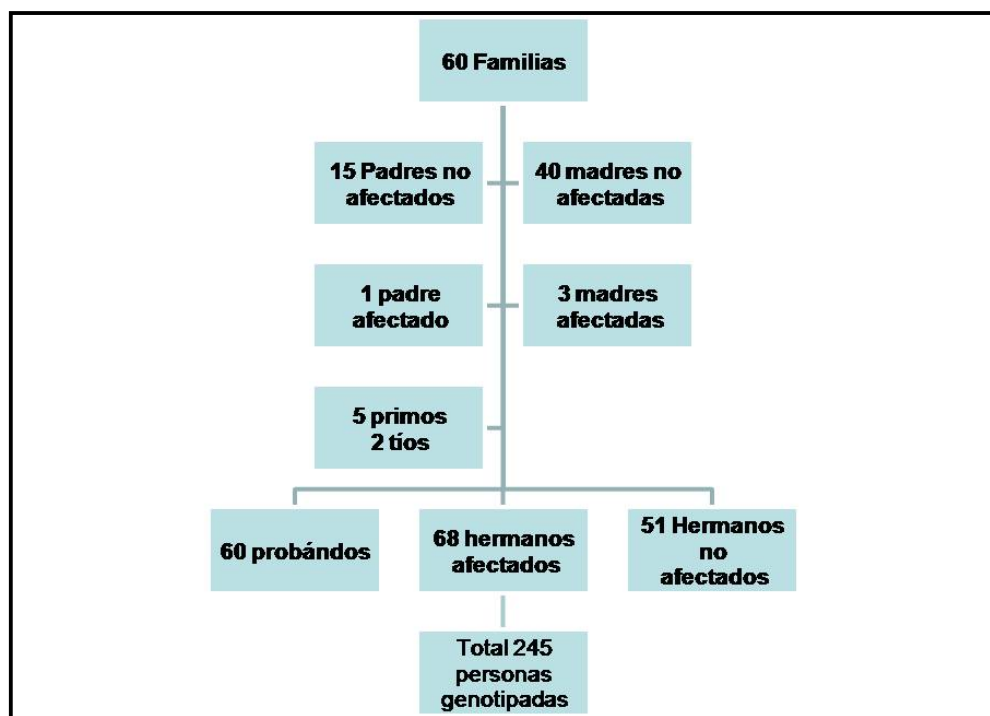


Figura11. Distribución y estatus familiar de las personas que participaron en el estudio.

La figura 12, muestra la distribución del tipo de familias que participaron en el estudio, se manejaron 4 grupos diferentes: familias con padre, madre y hermanos afectados, casos en los que sólo la madre y los hermanos afectados participaron, familias en las que sólo se obtuvieron los hermanos afectados y familias completas.

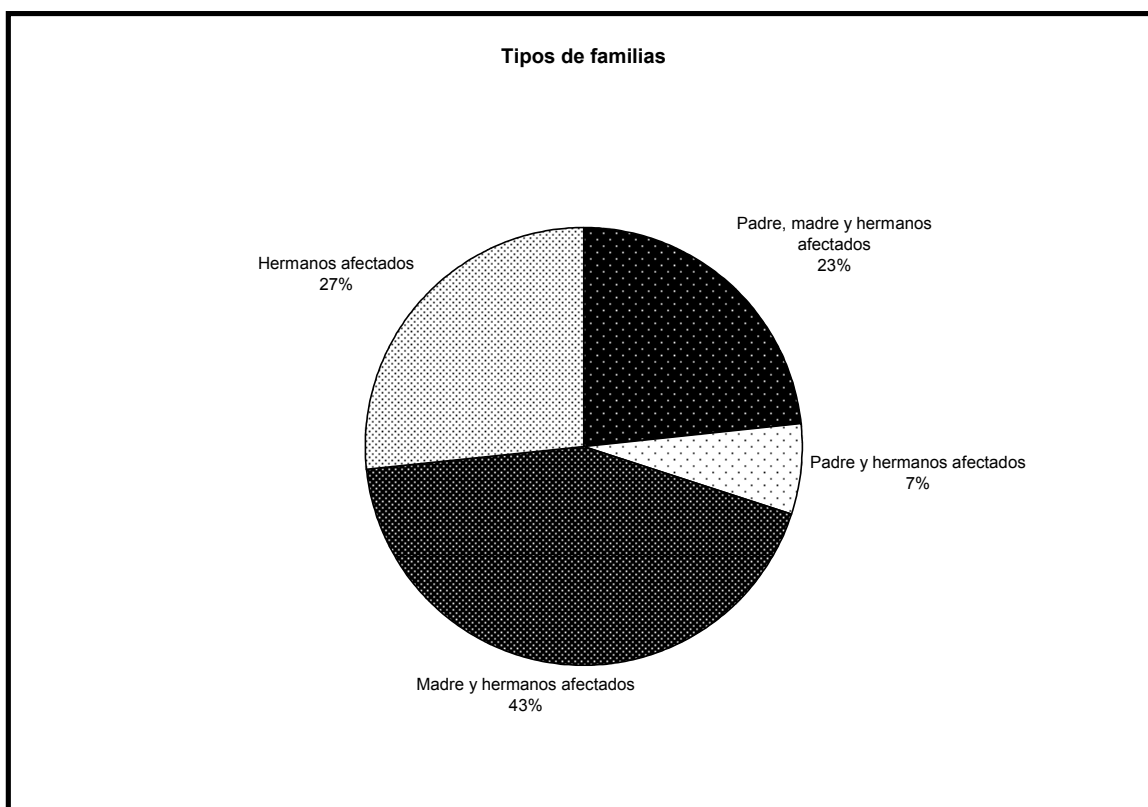


Figura 12. Distribución del tipo de familia que participó en este estudio de acuerdo al número de familias en cada grupo.

8.1.2 Descripción de la muestra

La distribución del tipo de esquizofrenia en los 60 probandos fue el siguiente: el 83% (n=49) presentó esquizofrenia del tipo paranoide, el 9% (n=6) indiferenciada y

el 8% (n=6) esquizofrenia tipo desorganizada. El nivel socio económico de la muestra fue el 70% (n=42) bajo, 25% (n=15) medio y el 5% (n=3) alto, y respecto al estado civil el 6.8% (n=4) de la muestra estaba casado, el 86.4% (n=51) soltero, el 6.8% (n=4) divorciado. El 45% (n=27) era desempleado, 14% (n=8) se dedicaba a las labores del hogar, el 3% (n=2) era estudiante, el 31% (n=19) trabajaba de manera informal medio tiempo y únicamente el 7% (n=4) tenía un empleo de tiempo completo.

8.1.3 Característica del grupo control

Se incluyeron 42 individuos sanos, la edad de 60 a 97 años, promedio de 81.6 ± 8.9 años de edad.

8.2 ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN BASADO EN POBLACIONES

8.2.1 Estudio de Asociación de ApoE y Esquizofrenia: Estudio de casos-control

El primer acercamiento para observar la asociación de ApoE con esquizofrenia fue mediante un estudio del tipo casos-contróles. La muestra analizada para el estudio de casos-contróles se encontró dentro del equilibrio de Harwy-Weinberg ($\chi^2=0.39$, $p=0.53$). La distribución de los genotipos y alelos de ApoE en nuestro estudio se presentan en el Tabla 5. No observamos diferencias entre los grupos en el análisis por genotipos ($\chi^2=1.02$, 2 gl, $p=0.59$) ni por alelos ($\chi^2=0.94$, 2 gl, $p=0.62$). El análisis por género no mostró diferencias estadísticamente significativas (genotipos $\chi^2= 0.98$, 2 gl, $p= 0.61$, alelos $\chi^2=0.94$, 2 gl, $p=0.62$).

Tabla 5. Frecuencia de genotipos y alelos de ApoE.

Genotipos	Controles	Probandos		
			Masculino	Femenino
$\epsilon 2/\epsilon 3$	4 (0.1)*	6 (0.1)	5 (0.1)	1 (0.05)
$\epsilon 3/\epsilon 3$	35 (0.83)	46 (0.76)	29 (0.8)	17 (0.8)
$\epsilon 3/\epsilon 4$	3 (0.07)	8 (0.14)	5 (0.1)	3 (1.5)
Total	42	60	39	21
Alelos				
$\epsilon 2$	4 (0.05)	6 (0.05)	10 (0.1)	2 (0.05)
$\epsilon 3$	77 (0.92)	106 (0.88)	58 (0.8)	34 (0.8)
$\epsilon 4$	3 (0.03)	8 (0.07)	10 (0.1)	6 (0.15)
Total	84	120	78	42

* n (%)

8.2.2 Estudio de Asociación de ApoE y Esquizofrenia: Estudio de Casos

Para observar la distribución alélica y genotípica de ApoE dividimos la muestra en tres grupos, probandos, hermanos afectados y hermanos no afectados y de acuerdo al género. En el grupo de probandos no se observaron diferencias entre género masculino y femenino ni por genotipos ($\chi^2=0.85$, 2 gl, $p=0.65$), ni por alelos ($\chi^2=0.94$, 2 gl, $p=0.62$). En el grupo de hermanos afectados tampoco se observó diferencia entre hombres y mujeres en la distribución de los genotipos ($\chi^2=7.54$, 3 gl, $p=0.05$). Sin embargo, el análisis por alelos si presentó diferencia significativa (**$\chi^2=7.658$, 2 gl, $p=0.021$**). Cuando se analizó el grupo de hermanos no afectados se observó una mayor frecuencia del genotipo $\epsilon 2/\epsilon 3$ en el género masculino comparado con el género femenino ($\chi^2=4.91$, 2 gl, $p=0.08$), aunque no es estadísticamente significativo, de la misma manera esto se observó en la comparación por alelos ($\chi^2= 4.864$, 2 gl, $p=0.08$) (Tabla 6). Al realizar un análisis

tomando en cuenta únicamente el género masculino del grupo de hermanos afectados con hombres del grupo de hermanos no afectados se observó una mayor frecuencia del genotipo $\epsilon 2/\epsilon 3$ ($\chi^2=8.41$, 2 gl, $p=0.014$) y del alelo $\epsilon 2$ ($\chi^2=8.010$, 2 gl, $p=0.018$), resultaron estadísticamente significativos.

Tabla 6. Distribución de las diferencias por género de acuerdo al genotipo de ApoE en probandos con esquizofrenia sus hermanos afectados y no afectados. n (%)

Genotipos	Probando		Hermano Afectado		Hermano No afectado	
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino
$\epsilon 2/\epsilon 4$	0	0	0	1 (0.02)	0	0
$\epsilon 3/\epsilon 2$	5 (0.1)	1 (0.04)	0	4 (0.14)	5 (0.23)	3 (0.09)
$\epsilon 3/\epsilon 3$	29 (0.8)	17 (0.8)	30 (0.94)	24 (0.68)	15 (0.72)	20 (0.64)
$\epsilon 3/\epsilon 4$	5 (0.1)	3 (0.16)	2 (0.06)	6 (0.16)	1 (0.05)	8 (0.27)
Total	39	21	32	35	21	31
Alelos						
$\epsilon 2$	5 (0.06)	1 (0.02)	0	5 (0.07)	5 (0.11)	3 (0.04)
$\epsilon 3$	68 (0.82)	38 (0.9)	62 (0.97)	58 (0.82)	36 (0.85)	51 (0.82)
$\epsilon 4$	5 (0.06)	3 (0.08)	2 (0.3)	7 (0.11)	1 (0.04)	8 (0.14)
Total	78	42	64	70	42	62

8.2.3 Asociación de las características clínicas con ApoE y Esquizofrenia

Para analizar la asociación de ApoE con la edad de inicio se dividió la muestra en edad de inicio temprano y edad de inicio tardío, La tabla 7 presenta la distribución de la edad de inicio de la esquizofrenia dividida en temprano (inicio ≤ 18 años) y tardío (>18 años). No se observó diferencia estadísticamente significativa entre probandos por genotipos ($\chi^2 =1.27$, 2 gl, $p=0.52$), ni por alelos ($\chi^2 =1.11$, 2 gl, $p=0.57$), tampoco se observó en los hermanos afectados por genotipos ($\chi^2 =0.42$, gl=2, $p=0.80$) ni por alelos ($\chi^2=1.66$, 2 gl, $p=0.43$).

Tabla 7. Distribución de la edad de inicio de la esquizofrenia de acuerdo al genotipo de ApoE.

Genotipos	Probando		Hermano Afectado	
	Temprano n=20 (%)	Tardío n=40 (%)	Temprano n=27 (%)	Tardío n=41 (%)
ε2/ε3	1 (0.05)*	5 (0.12)	1 (0.03)	3 (0.07)
ε3/ε3	17 (0.85)	29 (0.73)	23 (0.85)	33 (0.80)
ε3/ε4	2 (0.10)	6 (0.15)	3 (0.12)	4 (0.09)
ε2/ε4	0	0	0	1 (0.04)
Alelos				
ε2	1 (0.02)	5 (0.06)	1 (0.01)	3 (0.03)
ε3	37 (0.92)	69 (0.86)	51 (0.94)	72 (0.87)
ε4	2 (0.06)	6 (0.08)	2 (0.03)	7 (0.1)
Total de Alelos	(n=40)	(n=80)	(n=54)	(n=82)

* n (%).

Para analizar la gravedad de la enfermedad la muestra se subdividió en portadores de ApoE ε4 y no portadores de ApoE ε4. (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de las características clínicas por genotipo de ApoE en pacientes con esquizofrenia.

	Promedio $\pm$ ES, n		Estadística	
	No portador de ApoE 4	Portador de ApoE 4	p	T
Edad de Inicio	20.18 $\pm$ 0.49	22.44 $\pm$ 1.41	0.12	1.56
Edad de la Primera Hospitalización	23.66 $\pm$ 0.75	27.77 $\pm$ 1.49	0.0476	2.005
Número de Hospitalizaciones	4.103 $\pm$ 0.40	3.071 $\pm$ 0.73	0.33	0.97
Tiempo de Hospitalización (semanas)	76.12 $\pm$ 27.73	18.54 $\pm$ 8.71	0.42	0.80
DPNT ⁺	137.3 $\pm$ 21.90	167.8 $\pm$ 45.97	0.62	0.49
Aplanamiento de la afectividad	3.2 $\pm$ 1.22	3.86 $\pm$ 3.66	0.48	0.70
Alogia	9.44 $\pm$ 0.80	8.62 $\pm$ 1.99	0.70	0.37
Abolición	10.08 $\pm$ 0.74	9.00 $\pm$ 2.06	0.60	0.52
Anhedonia	13.42 $\pm$ 0.90	11.00 $\pm$ 3.10	0.35	0.93
Atención	5.94 $\pm$ 0.55	4.75 $\pm$ 1.67	0.44	0.76
Alucinación	5.92 $\pm$ 0.97	4.00 $\pm$ 1.96	0.45	0.74
Delirios	9.86 $\pm$ 1.41	6.37 $\pm$ 2.74	0.35	0.92
Conducta Bizarra	2.94 $\pm$ 0.60	1.62 $\pm$ 0.80	0.40	0.83
Trastorno Formal del Pensamiento	7.09 $\pm$ 0.96	4.62 $\pm$ 1.53	0.33	0.97

+ Duración de la psicosis no tratada medida en semanas

Se comparó el deterioro cognitivo en portadores y no portadores del alelo ApoE ϵ 4. No encontramos asociación estadísticamente significativa entre los portadores y no portadores de ApoE ϵ 4 y el deterioro cognitivo observado en los pacientes.

Tabla 9.

Tabla 9. Criterios del MMSE dividido en portadores y no portadores de APOE. Análisis por t-student.

	<i>Promedio ± ES, n</i>		<i>Estadística</i>	
	No portador ApoE ε4	Portador de ApoE ε4	p	T
Orientación	8.73 ± 0.29	8.88 ± 0.52	0.84	0.19
Atención y Cálculo	6.51 ± 0.27	6.41 ± 0.66	0.88	0.14
Memoria Inmediata	2.43 ± 0.075	2.29 ± 0.23	0.50	0.66
Estado Cognitivo	2.55 ± 0.066	2.61 ± 0.143	0.76	0.30
Total de MMSE	29.01 ± 0.49	29.28 ± 1.03	0.83	0.20

MMSE=Mini examen del estado mental

8.2.4 Asociación de ApoE-219G/T y esquizofrenia

La tabla 10 presenta la distribución alélica de ApoE-219 en los probandos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los géneros femenino y masculino por alelos ($\chi^2=.55$, 1 gl, $p=0.51$), ni por genotipos ($\chi^2=1.04$, 2 gl, $p=0.59$).

Tabla 10. Frecuencia de genotipos y alelos de ApoE -219 en población mexicana (%).

Genotipos	Probandos		
		Hombres	Mujeres
G-G	13 (21)	10 (26)	3 (16)
G-T	31 (52)	19 (48)	12 (56)
T-T	16 (27)	10 (26)	6 (28)
Totales	60	39	21
Alelos			
G	57 (46)	39 (50)	18 (43)
T	63 (53)	39 (50)	24 (47)
Totales	120	78	42

La muestra se dividió en dos grupos, con edad de inicio temprano (≤ 18) y edad de inicio tardío (≥ 18) de la esquizofrenia (Tabla 11). No se observaron diferencias en la muestra por genotipo ($\chi^2= 1.543$, 2 gl, $p= 0.467$) ni por alelos ($\chi^2=0.794$, 1 gl, $p=0.49$).

Tabla 11. Frecuencia de la edad de inicio en pacientes con esquizofrenia de acuerdo a los genotipos y alelos de ApoE-219G/T.

Genotipos	Inicio Temprano	Inicio Tardío
G-G	3 (30)	9 (18)
G-T	14 (35)	17 (59)
T-T	7 (35)	9 (23)
Totales	24 (100)	35 (100)
Alelos		
G	20 (42)	35 (50)
T	28 (48)	35 (50)
Totales	48	78

* n(%)

8.2.5 Asociación de COMT y esquizofrenia

La tabla 12 muestra la distribución de genotipos y alelos de *COMT* en pacientes con esquizofrenia. No se observa diferencia entre los grupos por genotipos ($\chi^2=2.79$, 4 gl $p=0.59$) ni por alelos ($\chi^2=2.00$ 2 gl, $p=0.36$). La muestra se dividió por género, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativa por alelos (hombres $\chi^2=0.07$, 4 gl, $p=0.96$, mujeres $\chi^2=3.34$, 2 gl, $p=0.18$) ni por genotipos (hombres $\chi^2=2.35$, 4 gl, $p=0.67$, mujeres $\chi^2=3.43$, 4 gl, $p=0.48$). La distribución de resultados es presentada en la tabla 13.

Tabla 12. Distribución de genotipos y alelos de *COMT* en pacientes con esquizofrenia, hermanos afectados y no afectados.

Genotipos	Probandos	Hermanos Afectados	H. No Afectados
Val-Val	23 (0.41)*	26 (0.37)	14 (0.28)
Val-Met	25 (0.45)	31 (0.44)	27 (0.54)
Met-Met	7 (0.14)	13 (0.19)	9 (0.18)
Total	55	70	50
Alelos			
Val	71 (0.64)	83 (0.59)	55 (0.55)
Met	39 (0.36)	57 (0.41)	45 (0.45)
Total	110	140	100

* n(%)

Tabla 13. Distribución de las diferencias por género de acuerdo al genotipo de *COMT* en probandos con esquizofrenia sus hermanos afectados y no afectados.

Genotipos	Probando*		Hermano Afectado		Hermano no Afectado	
	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer
Val-Val	13 (0.34)	10 (0.58)	10 (0.28)	14 (0.40)	4 (0.22)	10 (0.32)
Val-Met	18 (0.47)	5 (0.30)	20 (0.57)	13 (0.37)	13 (0.68)	14 (0.45)
Met-Met	7 (0.19)	2 (0.12)	5 (0.15)	8 (0.23)	2 (0.10)	7 (0.23)
Total	38	17	35	35	19	31
Alelos						
Val	44 (0.58)	25 (0.73)	40 (0.57)	41 (0.58)	21 (0.55)	34 (0.55)
Met	32 (0.42)	9 (0.26)	30 (0.43)	29 (0.42)	17 (0.44)	28 (0.45)
Total	76	34	70	70	38	62

* n(%)

8.2.5.1 Asociación de las características clínicas de *COMT* y esquizofrenia

Basados en la teoría de que *COMT* puede modular la edad de inicio de la esquizofrenia, la muestra se dividió de acuerdo a la edad de inicio en temprano y tardío, el inicio temprano fue establecido de acuerdo a lo reportado en la literatura en 18 años y mayor a 19 inicio tardío. La tabla 14 muestra los grupos de inicio temprano y tardío en los probando y sus hermanos afectados. Sin embargo, no se observaron diferencias entre probandos (genotipos $\chi^2=0.60$, $p=0.73$, alelos $\chi^2=0.49$, $p=0.48$) ni entre los hermanos afectados (genotipos $\chi^2=0.93$, $p=0.62$, alelos $\chi^2=0.99$, $p=0.31$).

Tabla 14. Distribución de la edad de inicio de la esquizofrenia de acuerdo al genotipo de *COMT*. n(%).

	Probando		Hermano Afectado	
	Inicio Temprano	Inicio Tardío	Inicio Temprano	Inicio Tardío
Genotipos				
Val-Val	6 (0.35)*	16 (0.42)	10 (0.43)	16 (0.34)
Val-Met	8 (0.47)	18 (0.47)	10 (0.43)	21 (0.45)
Met-Met	3 (0.18)	4 (0.11)	3 (0.14)	10 (0.21)
Total	17	38	23	47
Alelos				
Val	20 (0.59)	50 (0.66)	30 (0.56)	53 (0.56)
Met	14 (0.41)	26 (0.34)	16 (0.34)	41 (0.44)
Total	34	76	46	94

* n(%)

En el análisis de asociación de COMT con los síntomas positivos y negativos, se analizó cada una de las sub-escalas de SANS y SAPS y se asoció con los genotipos de COMT, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 15).

Tabla 15. Asociación de los genotipos de COMT y la gravedad de la enfermedad. Escala de evaluación de síntomas positivos (SAPS) y escala de evaluación de síntomas negativos (SANS).

	COMT^{V/V} n=23 (Promedio, ES)	COMT^{V/M} n=25 (Promedio, ES)	COMT^{M/M} n=7 (Promedio, ES)	P1*
Aplanamiento de la afectividad	18.26±1.79	14.84±1.96	14.76±2.77	0.38
Alogia	10.34±1.15	7.76±1.24	10.71±1.47	0.23
Abolición	10.73±1.16	9.2±1.06	8.85±2.06	0.55
Anhedonia	14.30±1.43	12.2±1.30	13.14±2.66	0.56
Atención:	6.04±0.82	5.48±0.84	6.14±1.22	0.86
Total SANS	60.0±5.75	49.48±5.64	53.57±8.83	0.41
Alucinaciones	5.73±1.51	5.36±1.28	4.19±2.04	0.85
Delirio	7.54±2.0	10.12±2.19	8.85±2.78	0.67
Conducta Bizarra	1.83±0.6	3.32±0.92	1.71±1.22	0.35
PFTD**	6.25±1.34	6.76±1.47	7.57±2.47	0.90
Total SAPS	21.12±4.99	25.±5.27	22.28±6.94	0.81

*P1=ANOVA **PFTD = Trastorno formal del pensamiento

8.2.6 Estudio de Meta-Análisis

Primero se procedió a la búsqueda bibliográfica. Se identificaron 24 trabajos, sin embargo, sólo 21 estudios cumplieron con los criterios y sumando nuestra muestra, se obtuvieron 22 estudios de asociación, con un total de 2810 casos y 4197 controles. La tabla 16 muestra la información descriptiva y el tamaño de muestra para cada uno de los estudios.

Los OR y los intervalos de confianza (IC) de la muestra total son presentados en la figura 13. En el análisis por efectos aleatorios, la suma de los OR fue de 1.06 y los IC 95%: 0.89-1.27, $p=0.1586$, indicando que en la muestra total no se encuentra asociación entre el alelo $\epsilon 4$ y esquizofrenia. Sin embargo, los datos mostraron la presencia de heterogeneidad ($\chi^2=37.7$, $gl=21$, $p=0.0140$). Al analizar la gráfica de Gallbraith se identificó que la fuente de error fue dada por los trabajos de Harrington y cols., [90] Liu et al [101] y Chen et al. [103] (Figura 14).

Tabla 16. Estudios de asociación de casos y controles entre el alelo $\epsilon 4$ de ApoE y esquizofrenia incluidos en el meta-análisis.

País	Criterio Diagnóstico	(n)*		Autor
		Esq**	Control	
Estados Unidos	DSM-III-R	93	106	Arnold y cols., 1997 [93]
Finlandia	DSM-IV	94	98	Kampman y cols., 2004 [24]
China	DSM-IV	579	1528	Liu y cols., 2003 [101]
España	ICD-9	365	584	Martorell y cols., 2001 [100]
Inglaterra	No especificado	42	131	Harrington y cols., 1995 [90]
Taiwán	DSM-IV	237	137	Chen y cols., 1999 [103]
España	ICD-10	114	94	Durany y cols., 2000 [92]
Estados Unidos	DSM-III-R	40	57	Lodoso Torrecilla y cols., 2006 [95]
Japón	DSM-IV	54	33	Igata-Yi y cols., 1997 [97]
Canadá	No especificado	51	35	Joober y cols., 1996 [96]
Japón	DSM-III-R	122	126	Kimura y cols., 1997 [97]
Japón	DSM-IV	314	118	Kimura y cols., 2000 [97]
Inglaterra	DSM-IV	60	60	Han y cols., 2006 [104]
Estados Unidos	DSM-IV	28	26	Moberg y cols., 2006 [105]
España	DSM-IV	106	250	Saiz y cols., 2002 [106]
Francia	DSM-IV	114	91	Schurhoff y cols., 2003 [69]
Italia	DSM-III-R	69	121	Sorbi y cols., 1998 [99]
Francia	DMS-III-R	45	98	Thibaut y cols., 1999 [107]
Taiwán	DSM-IV	62	63	Hennah y cols., 2007 [64]
México	DSM-IV	60	42	Tovilla, y cols., (2008) [108]
Estados Unidos	DSM-III-R	63	301	Town y cols., 1997 [98]
Alemania	DSM-III-R	98	98	Zhu y cols., 1996 [55]

*n= Tamaño de la muestra, **Esq=Esquizofrenia

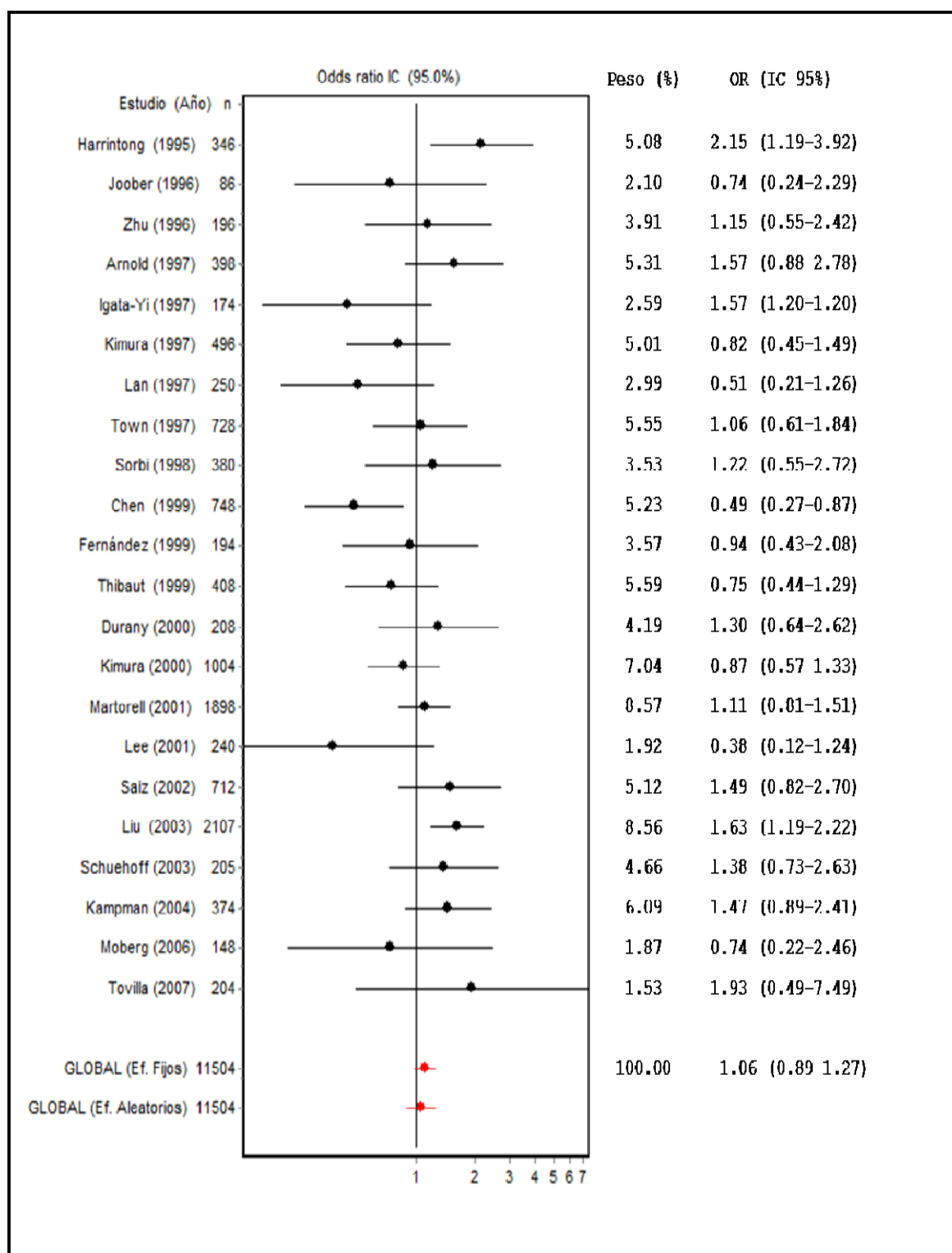


Figura 13. Efectos aleatorios, IC 95% y OR de cada uno de los estudios y del meta-análisis de los 22 trabajos del alelo $\epsilon 4$ de APOE y esquizofrenia

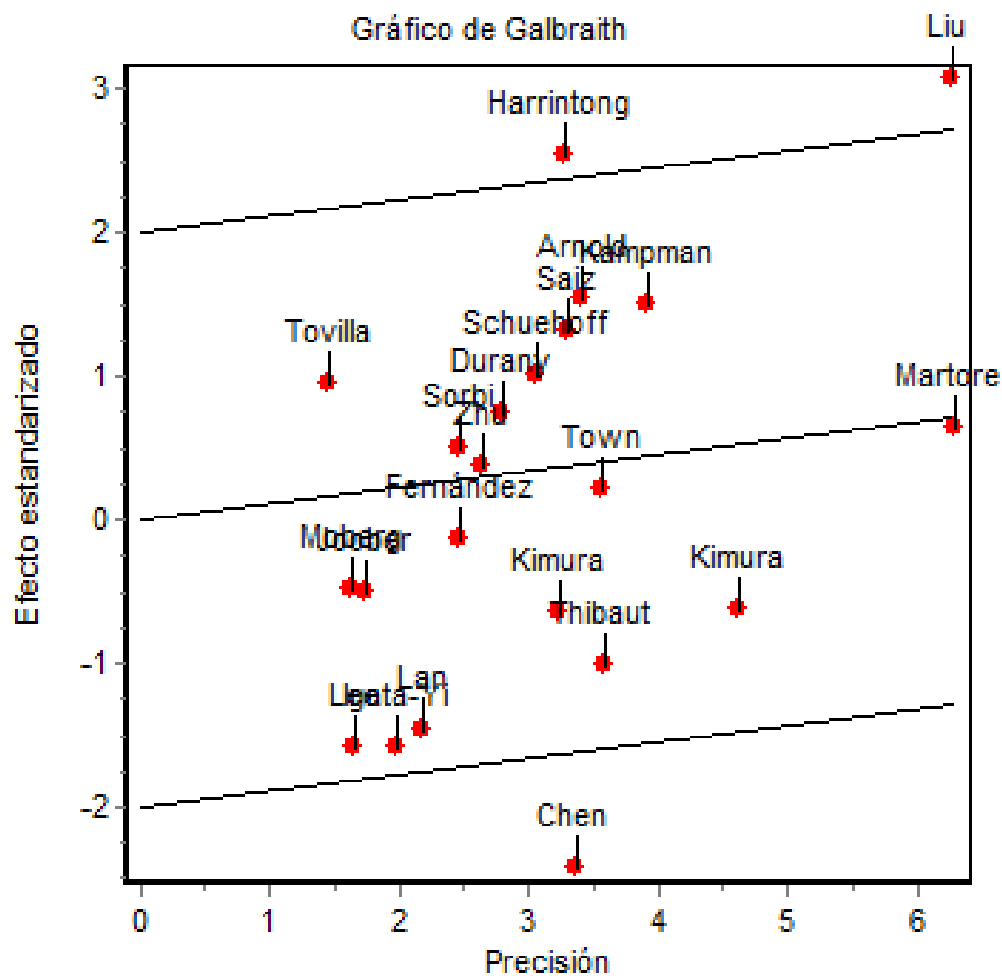


Figura 14. Gráfico de Galbraith. Heterogeneidad observada en la muestra influenciada por los estudios que se observan fuera de los intervalos de confianza.

En un segundo análisis, eliminando estos trabajos, se comprueba el resultado inicial de no asociación entre el alelo $\epsilon 4$ y esquizofrenia ($OR=1.04$, IC 95% 0.90-1.21, $p=0.184$) sin la presencia de heterogeneidad ($\chi^2=18.8$, $gl=18$, $p=0.4$) (Figura 15)

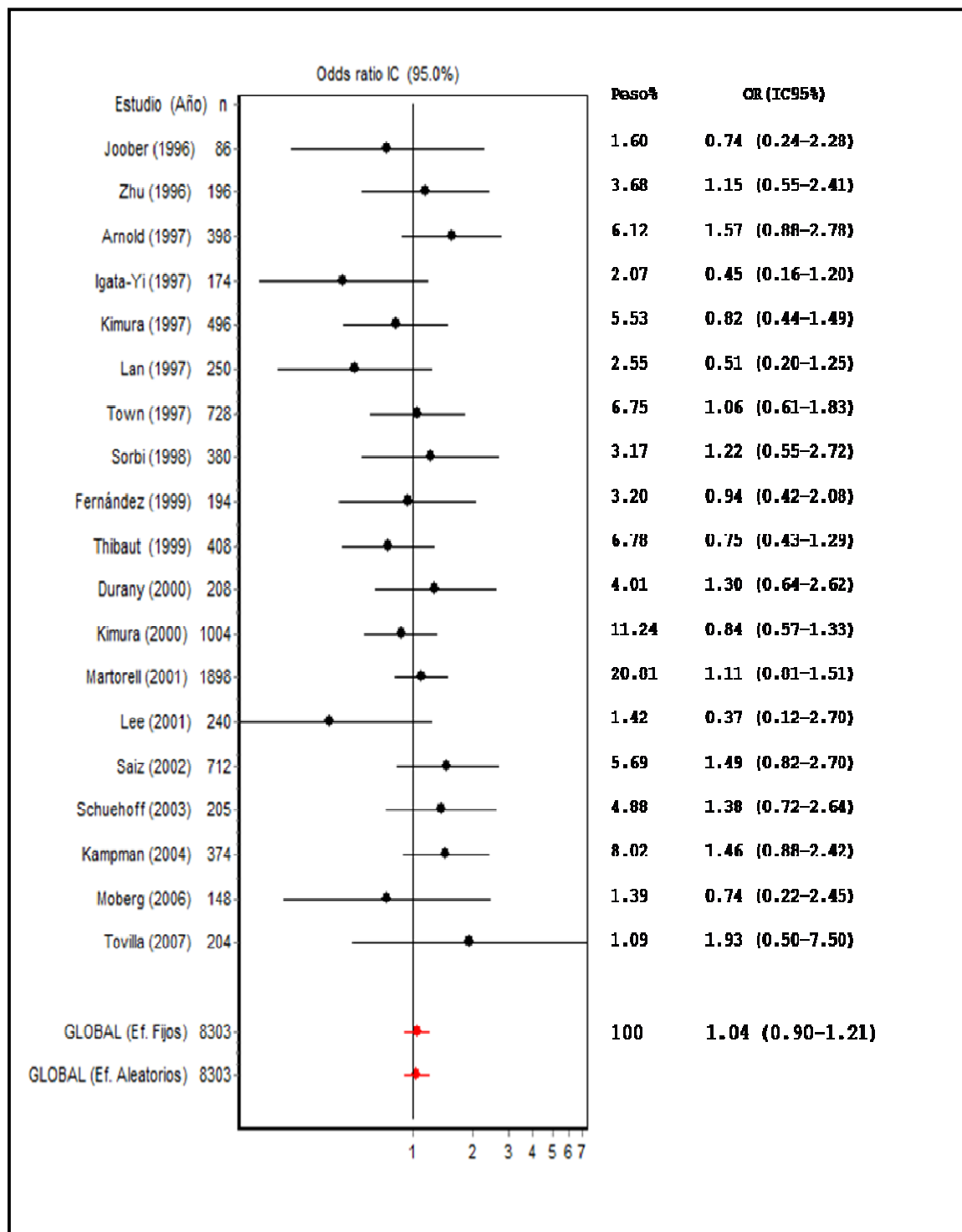


Figura 15. Meta-análisis de los 19 trabajos del alelo $\epsilon 4$ de APOE y esquizofrenia, una vez corregida la heterogeneidad

Al analizar el gráfico de Influencia se observó que nuestro meta-análisis conserva la dirección del efecto global (Figura 16)

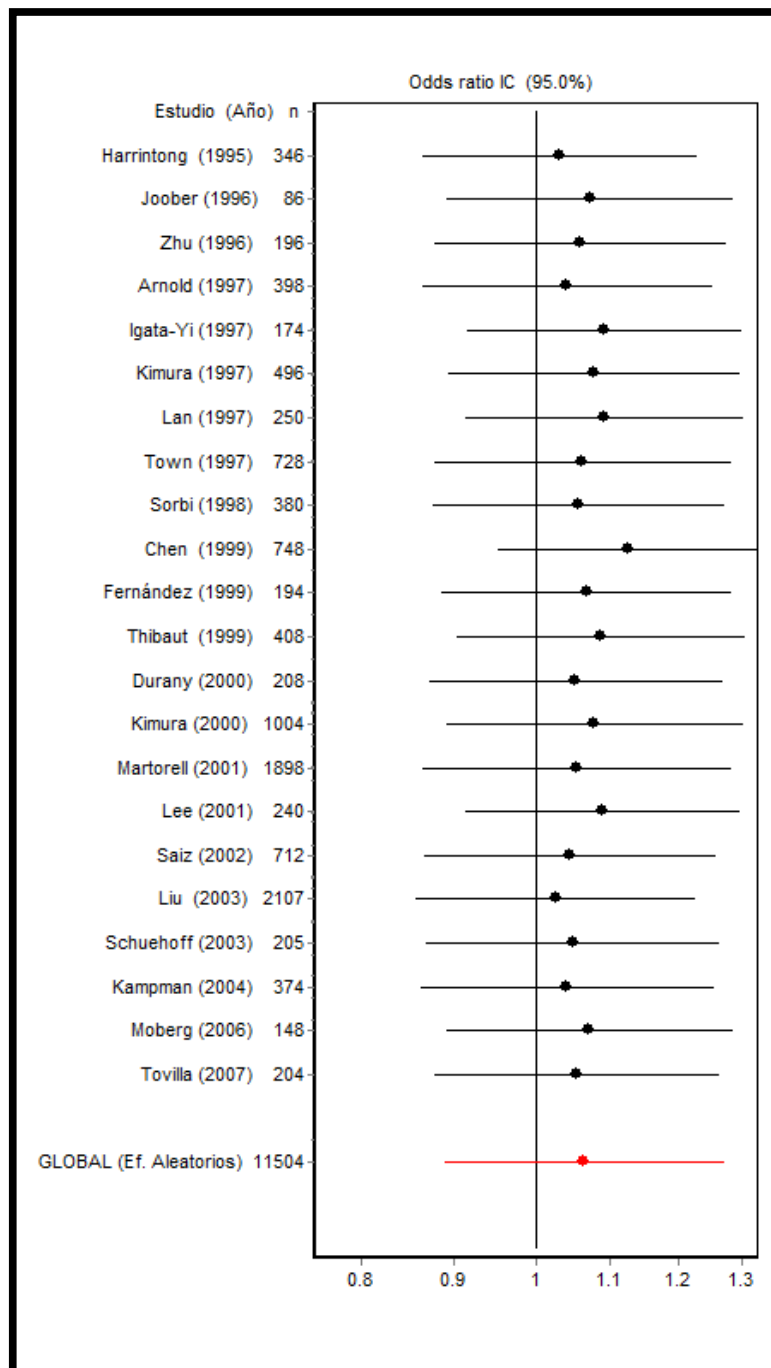


Figura 16. Gráfico de influencia. Muestra la fortaleza del meta-análisis al conservar éste la dirección del efecto global.

8.3 ESTUDIOS BASADO EN FAMILIAS

8.3.1 Estudio de Pares de Hermanos afectados

8.3.1.1 Sumario Estadístico

En este estudio, todos los 60 árboles familiares consistían de 2 generaciones, la tabla 17 presenta el número de pares formados dentro de las familias así como los datos tomados de forma individual.

Tabla 17. Sumario Estadístico, de la muestra analizada por PEDINFO de S.A.G.E.

Pares		Individual	
Tomados sin parentesco	366	Hombres	153
Hermanos-hermanos	46	Mujeres	151
Mujer-mujer	212		
Hermanos-Hermanas	107		

8.3.1.2 Datos de la muestra

Analizamos la muestra para observar errores de tipo mendeliano. En la tabla 18 se puede observar que en la muestra no están presentes errores de tipo mendeliano para ninguno de los genes analizados.

Tabla 18. Datos de Calidad de la muestra, analizados por MARMAKER de S.A.G.E.

Marcador	Inconsistencias	Núm. De Familia	Total
		Datos	
ApoE	0	60	60
ApoE-219	0	60	60
COMT	0	60	60

8.3.1.3 Frecuencias alélicas y genotípicas de la muestra

Al analizar las frecuencias genotípicas y alélicas en toda la muestra se observaron las siguientes frecuencias. (Tabla 19).

Tabla 19. Frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores utilizados en el estudio, analizadas por GENIBD de S.A.G.E.5.5.

Marcador	Alelos		Genotipos	
ApoE	2	0.05	2/2	0.003
	3	0.85	3/2	0.09
	4	0.08	3/3	0.73
			3/4	0.14
			4/2	0.009
			4/4	0.007
ApoE-219	G	0.45	G/G	0.21
	T	0.55	G/T	0.50
			T/T	0.29
COMT	Val	0.6	Val/Val	0.34
	Met	0.4	Val/Met	0.49
			Met/Met	0.17

8.3.2 Estudio de Asociación en Presencia de Ligamiento.

8.3.2.1 ApoE

La tabla 20 presenta los resultados de alelos compartidos para el marcador ApoE para la muestra general y subdividida de acuerdo al género. De manera interesante, se observó asociación en presencia de ligamiento porque el alelo $\epsilon 3$ de ApoE presenta mayor número de alelos compartidos en la muestra general ($\chi^2=6.24$, $p=0.012$); y se observó que este exceso de alelos compartidos es aportado por el género femenino ($\chi^2=8.33$, $p=0.003$)

Tabla 20. Análisis de Alelos compartido por IPD del gen ApoE usando X-APL.

		$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
General	Frecuencia	0.062	0.858	0.08
	Observada ^a	10.00	226.0	16
	Esperada ^b	15.54	215.98	21.62
	Varianza ^c	7.50	16.00	11.43
	p	0.042	0.012	0.096
Mujeres	Frecuencia	0.08	0.78	0.14
	Observada	3.00	65	8.0
	Esperada	6.33	58.98	12.74
	Varianza	2.74	4.32	6.8
	P	0.049	0.003	0.07
Hombres	Frecuencia	0.03	0.91	0.06
	Observada	2	94.0	4.0
	Esperada	3.75	90.03	6.45
	Varianza	2.8	6.54	4.18
	p	0.296	0.12	0.23

^a Observada: Alelos compartidos observados

^b Esperada: Alelos compartidos esperados

^c Varianza: Varianza (O-E)

8.3.2.2 Asociación basada en familia e inicio temprano de la esquizofrenia

Se analizó el polimorfismo de ApoE para determinar si se encontraba asociado con el inicio temprano ó tardío de la enfermedad. Cuando se analizó la muestra general, no se observó diferencia en ninguno de los alelos transmitidos de ApoE. Sin embargo, en las familia con inicio temprano se observó una poca transmisión del alelo ApoE $\epsilon 2$ (**$p=0.02$**), cuando se analizó en familias con inicio tardío no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Tabla 21.

Tabla 21. Análisis de asociación del polimorfismo ApoE y la edad de inicio en familias con esquizofrenia usando X-APL.

Inicio		Alelo $\epsilon 2$	Alelo $\epsilon 3$	Alelo $\epsilon 4$
Temprano				
	Frecuencia	0.01	0.85	0.14
	Varianza (O-E)	0.000001	8.07	7.92
	p	0.02	0.31	0.34
Inicio Tardío				
	Frecuencia	0.04	0.85	0.10
	Varianza (O-E)	1.66	2.83	4.19
	p	0.33	0.54	0.96

8.3.3.1 ApoE-219G/T

La tabla 22, presenta los resultados del análisis de alelos compartidos, para el marcador ApoE-219G/T, no se observó asociación en presencia de ligamiento entre los alelos transmitidos y no transmitidos cuando se analizó toda la muestra, sin embargo, cuando se analizó la muestra dividida de acuerdo al género, se observó una asociación sugestiva en presencia de ligamiento en el grupo de varones.

Tabla 22. Análisis de Alelos compartido por IPD del marcador ApoE-219G/T usando X-APL.

		G	T
General	Frecuencia	0.45	0.55
	Observada ^a	123.0	133.0
	Esperada ^b	114.84	141.15
	Varianza ^c	18.05	18.05
	p	0.054	0.054
Mujeres	Frecuencia	0.37	0.63
	Observada	28.0	48.0
	Esperada	27.65	48.34
	Varianza	4.95	4.95
	P	0.87	0.87
Hombres	Frecuencia	0.46	0.54
	Observada	54.0	48.0
	Esperada	46.88	55.11
	Varianza	9.54	9.54
	p	0.021	0.021

^a Observada: Alelos compartidos observados

^b Esperada: Alelos compartidos esperados

^c Varianza: Varianza (O-E)

8.3.3.2 Asociación basada en familia e inicio temprano de la esquizofrenia

Se analizaron los polimorfismos de ApoE-219G/T para observar si los alelos de este polimorfismo se encuentran en asociación con el inicio temprano ó tardío de la enfermedad, sin embargo no se observó diferencia en ninguno de los alelos transmitidos de ApoE-219G/T. El análisis sólo se pudo realizar en familias con inicio tardío de la enfermedad (tabla 23) dado que muy pocas familias fueron concordantes para el inicio temprano de la enfermedad.

Tabla 23. Análisis de asociación del polimorfismo ApoE-219G/T y el inicio tardío de la esquizofrenia usando X-APL.

Alelo	Frecuencia	Varianza (O-E)	p
G	0.49	7.56	0.64
T	0.51	7.56	0.64

8.3.3.3 Análisis de Haplotipos

Cuando se realizó el análisis por haplotipos, se observó que el haplotipo más transmitido fue el ApoE ϵ 3/ApoE-219G. Tabla 24.

Tabla 24. Pares de haplotipos transmitidos (ApoE ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4/ApoE-219G/T) analizados por X-APL.

		ApoE ϵ 3/ApoE-219G	ApoE ϵ 4/ApoE-219G	ApoE ϵ 2/ApoE-219G	ApoE ϵ 3/ApoE-219T	ApoE ϵ 4/ApoE-219T	ApoE ϵ 2/ApoE-219T
General	Frecuencia	0.41	0.02	0.03	0.44	0.09	0.01
	Observada ^a	113.0	7.0	5.0	103.0	18.00	0.00
	Esperada ^b	101.51	6.48	7.94	109.19	22.05	3.52
	Varianza	22.37	2.63	3.31	13.22	8.95	4.21
	p	0.015	0.75	0.105	0.088	0.17	0.08
Femenino	Frecuencia	0.30	0.03	0.03	0.49	0.14	0.01
	Observada ^a	26.0	3.0	1.0	36.0	8.0	0.0
	Esperada ^b	24.66	2.22	2.35	36.89	11.06	1.22
	Varianza	3.62	0.44	1.39	3.04	4.96	1.42
	p	0.483	0.242	0.251	0.606	0.169	0.305
Masculino	Frecuencia	0.49	0.01	0.02	0.41	0.07	0.0
	Observada ^a	56.0	1.0	1.0	40.0	6.0	0.0
	Esperada ^b	49.70	1.06	2.24	44.18	7.70	0.0
	Varianza	11.03	0.003	0.67	8.14	3.49	0.0
	p	0.058	0.246	0.127	0.142	0.361	0.0

La cantidad de haplotipos omitidos en el análisis fue menor al 5%.

^a Observada: alelos compartidos observados

^b Esperada: alelos compartidos esperados

^c Varianza: varianza de observada menos esperada

8.3.3.4 COMT

La tabla 25 presenta los resultados de asociación en presencia de ligamiento del análisis de alelos compartidos por IPD, para el marcador COMT. El análisis con este gen no presentó diferencias.

Tabla 25. Análisis de alelos compartidos por IPD del marcador COMT usando X-APL.

		Val	Met
General	Frecuencia	0.6	0.4
	Observada ^a	158.0	98.0
	Esperada ^b	155.7	100.2
	Varianza ^c	13.9	13.9
	p	0.054	0.054
Mujeres	Frecuencia	0.6	0.3
	Observada	63.0	39.0
	Esperada	65.0	36.9
	Varianza	3.0	3.0
	p	0.23	0.23
Hombres	Frecuencia	0.54	0.45
	Observada	56.0	38.0
	Esperada	53.8	40.16
	Varianza	9.17	9.17
	p	0.47	0.47

^a Observada: alelos compartidos observados

^b Esperada: alelos compartidos esperados

^c Varianza: varianza de observada menos esperada

9 DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se realizó un estudio de asociación basado en familias de los polimorfismos ApoE, ApoE-219G/T y COMTVal158/Met, utilizando la metodología de asociación en presencia de ligamiento, también, se realizaron estudios basados en poblaciones del tipo casos-controles para el gen ApoE y esquizofrenia, y se realizó un meta-análisis de ApoE ϵ 4 y la esquizofrenia y por ultimo se asociaron los genes ApoE y COMT con la gravedad de la enfermedad en los probandos con esquizofrenia.

9.1 Estudio de Asociación basado en poblaciones

9.1.1 Estudios de asociación de ApoE y Esquizofrenia

Se asocia un factor de riesgo (alelo ó genotipo) y la enfermedad cuando existe diferencia de la frecuencia a la exposición de este factor en las poblaciones estudiadas es decir en casos y en controles. Los estudios de asociación son metodologías ampliamente utilizadas en la búsqueda de genes candidatos en enfermedades complejas, a diferencia de los estudios de ligamiento, los estudios de asociación no requieren que se conozca el modelo genético de la enfermedad y tienen como ventaja que se puede controlar el fenotipo a estudiar y a la vez es posible tener grupos con características homogéneas [69], también pueden detectar genes de pequeño efecto, por lo que se decidió estudiar el gen de la

ApoE en esquizofrenia utilizando este tipo de estrategia. Es importante mencionar que este es el primer estudio de asociación de ApoE y esquizofrenia en población mexicana.

Nuestros datos no replican los hallazgos de asociación entre el alelo $\epsilon 4$ de ApoE y esquizofrenia [90], ni en el análisis de la edad de inicio y gravedad del trastorno [100, 102]. Sin embargo la falta de asociación obtenida en este estudio está acorde a lo reportado por otros grupos [92, 96, 97, 147]. Estos datos sugieren que ApoE $\epsilon 4$ no está asociado con la esquizofrenia, sin embargo, la pérdida de reproducibilidad en los resultados, puede ser entendida cuando se analizan más cuidadosamente los trabajos en su conjunto. Uno de los factores importantes que se ha propuesto que influye en la falta de reproducibilidad de los resultados son diferencias en el criterio diagnóstico utilizado en los estudios [90]. Debido a que entre otros criterios el diagnóstico de esquizofrenia se basa en los orientados en síntomas positivos y negativos, la selección de los casos debe obedecer estas clasificaciones (subtipos de esquizofrenia) y no tomar a la esquizofrenia como homogénea en cuanto a su etiología. En este sentido se ha reportado la presencia de errores en la clasificación de los pacientes esquizofrénicos hasta en un 50% [106]. Este alto porcentaje de error en el diagnóstico de la enfermedad y en la clasificación de los pacientes se presenta en estudios donde los criterios que se utilizan para la selección de éstos no son rigurosos. Así, la diferencia entre los reportes puede deberse a un mal diagnóstico de los pacientes, sin embargo, se ha propuesto que pudiera ser también resultado de la diferencia en la naturaleza de la muestra [69]. Otro factor que la literatura sugiere podría estar involucrado en la pérdida de reproducibilidad de los resultados es el tamaño de muestra, pues se ha

observado que los estudios que han analizado la asociación de ApoE y esquizofrenia presentan bajos números de casos y controles, menores a 50 lo que puede dar como resultados falsas asociaciones [100, 106, 108].

Otra de las posibles causas por las que no se observa la asociación entre el gen de la ApoE y esquizofrenia en población mexicana podría ser por la presencia de estratificación poblacional, ya que en un estudio realizado con grupos indígenas mexicanos, se reportan diferencias en las frecuencias de alelos del gen de la ApoE entre Mestizos, Nahuas, Coras y Huicholes, demostrando la presencia de heterogeneidad en población mexicana en este locus particular [147] por lo que estudios como el del presente trabajo utilizando la metodología de asociación basada en familias, en el que participan pares de hermanos afectados, pueden reducir la presencia de heterogeneidad dándole mayor fuerza al resultado al reducir los falsos positivos.

Por otro lado, en la literatura existen pocos reportes que analizan la asociación de ApoE $\epsilon 4$ y la edad de inicio de la esquizofrenia, hasta el momento no se ha encontrado asociación lo cual se replica en el presente estudio [55, 95, 98, 99, 105-107]. De la misma manera, se ha propuesto que edad de la primera hospitalización y el número de hospitalizaciones son marcadores de la gravedad de la enfermedad, sin embargo, este análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas en la muestra. Los resultados sugieren que en la población mexicana ApoE $\epsilon 4$ no está asociado a un inicio temprano de la enfermedad ni una mayor gravedad de los síntomas de la esquizofrenia.

Es interesante destacar que en el grupo de hermanos no afectados, se observó mayor frecuencia del alelo ApoE $\epsilon 2$ comparados con el grupo de probandos y de

hermanos afectados, esto sugiere que ApoE ϵ 2 puede estar participando como un factor protector al desarrollo de la esquizofrenia. Aunque este resultado, está acorde con otros reportados previamente, [93, 97], deben ser tomados con cautela, ya que el pequeño tamaño de la muestra y la ausencia del genotipo ApoE ϵ 2/2 en este estudio, no permitió evaluar con mayor precisión el efecto del alelo ϵ 2 en la protección sobre la edad de inicio de la esquizofrenia. Se ha observado que ApoE ϵ 2 también tiene un efecto protector para otras enfermedades como el síndrome de Down [87], por lo tanto, esta evidencia sugiere que la falta de ApoE ϵ 2 en la muestra está relacionada con la mayor frecuencia de esquizofrenia en la población mexicana. Es necesario estudios futuros con mayor tamaño de muestra para observar el efecto de ApoE ϵ 2 en la esquizofrenia y en especial en la población mexicana.

9.1.2 Asociación de las características clínicas

La literatura reporta que el daño cognitivo en la esquizofrenia es común y se refleja en diferentes dominios cognitivos, como son, déficit en memoria verbal, de no verbal, en memoria global, en la coordinación de los movimientos, en atención visual y auditiva, en inteligencia general, en habilidades espaciales, en funciones ejecutivas, en lenguaje y en el funcionamiento social [138]. Sin embargo, las principales funciones cognitivas afectadas son: déficit de atención, deterioro en la memoria verbal y déficit en la memoria de trabajo. El déficit de atención se caracteriza por la pérdida de la atención selectiva, cambios en la concentración y

en la atención voluntaria [50]. El análisis del estado cognitivo de los pacientes y su asociación con ApoE en este estudio no mostró asociación de ApoE ϵ 4 y el deterioro cognitivo. La probable asociación de ApoE ϵ 4 y esquizofrenia se sustenta en reportes que asocia a los portadores ApoE ϵ 4 con anomalías en la región temporal y que esto podría alterar la cognición de los pacientes. Otra asociación de ApoE ϵ 4 parte de la hipótesis de que el deterioro cognitivo presente en etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer es similar al observado en los pacientes con esquizofrenia [148, 149], sin embargo, es probable que otros circuitos neuronales no permitan observar la asociación de ApoE ϵ 4 y el deterioro cognitivo en los pacientes con esquizofrenia [148, 149].

Por otro lado, se analizó la gravedad de los síntomas positivos y negativos, sin embargo, no se observó asociación de ApoE ϵ 4 con los síntomas de la enfermedad. Los resultados concuerdan con reportes anteriores como el publicado en 1997 por Pickar y cols., [102] que no observó asociación de ApoE ϵ 4 y los síntomas positivos. Una de las posibles explicaciones es que las edades de los pacientes incluidos en el estudio no son homogéneas y esto pudiera afectar al observar el efecto de ApoE ϵ 4 en gravedad de los síntomas positivos y la gravedad de los síntomas negativos. Otra posible causa puede deberse a que las escalas aplicadas miden la gravedad de la enfermedad en un tiempo dado y no representan la gravedad de los pacientes a lo largo de la vida, por lo que son necesarias más investigaciones que analicen la participación de ApoE ϵ 4 en la severidad del fenotipo clínico de los pacientes con esquizofrenia [108].

Por otro lado, respecto al polimorfismo ApoE-219G/T no observamos asociación de este y la edad de inicio de la enfermedad, deterioro cognitivo y la gravedad de

los síntomas positivos y negativos. La literatura sólo presenta un estudio de asociación entre esta región regulatoria de ApoE y la esquizofrenia [150] y con base en estos resultados y lo encontrado en la literatura no se puede descartar que la región promotora de ApoE confiere un aumento a la susceptibilidad de desarrollar la esquizofrenia, principalmente por tener únicamente dos estudios reportados a la fecha con muy bajo tamaño de muestra, sin embargo, esto abre la posibilidad de profundizar en el estudio de esta región polimórfica para evaluar más a fondo el papel de ApoE-219G/T y la esquizofrenia.

Por otro lado, el gen de la COMT se ha estudiado ampliamente en diversos desórdenes neuropsiquiátricos, y se sugiere como un gen candidato al desarrollo de la esquizofrenia [151]. Estudios recientes presentan asociación del alelo Val158 con esquizofrenia, sin embargo, por la falta de reproducibilidad de los resultados éstos no son concluyentes [125]. En este estudio, no se observó asociación entre los genotipos de *COMT* y esquizofrenia, los resultados están de acuerdo a los publicados por otros grupos [119, 152, 153], sin embargo, existen reportes en los que se observa susceptibilidad al desarrollo de esquizofrenia en pacientes con el alelo Val158 [124, 154] y otros con Met158 [110, 155], por lo que los resultados son inconsistentes. Cuando presentan reportes por género la asociación [110] se observa principalmente en mujeres [151], sin embargo, en el presente estudio no se observó esta asociación. La diferencia en los resultados quizá puede ser explicada en el contexto de algunas limitaciones, como el tamaño pequeño de la muestra, por lo que se requiere de trabajos con mayor tamaño de muestra que podrían aportar mayor información sobre el papel de COMT Val158Met en la esquizofrenia.

A la región prefrontal, se le ha asociado con baja señalización dopaminérgica prefrontal [111], esta se presenta en mayor grado cuando los pacientes son portadores del genotipo Val158Val y existe evidencia que este genotipo pudiera afectar la gravedad de los síntomas negativos, por lo que se dice que los portadores del alelo Val158 presentan mayor gravedad de los síntomas de la esquizofrenia [78], sin embargo, al analizar el total de la muestra, no se observó diferencia en la gravedad de los síntomas positivos y negativos en los pacientes portadores de los genotipos y alelos de COMT, esto concuerda con los reportes previamente publicados [123]. Para explicar esta discrepancia en los resultados, se propone que la respuesta es diferente en cada paciente dependiendo de genes en otras regiones que pueden ser más susceptibles a la variabilidad enzimática de COMT [133].

Recientemente, se ha planteado que la estabilidad cognitiva pudiera estar correlacionada a la atención y las alucinaciones [156]. Es decir pacientes con alucinaciones leves presentan menor deterioro cognitivo. Cuando se evaluaron las funciones cognitivas de los pacientes no se observaron diferencias estadísticamente significativas. En reciente publicación Hanet y cols., [104], observaron mayor gravedad de delirios y alucinaciones en pacientes portadores del alelo Met que en Val. Lo que puede sugerir que los genotipos de COMT pueden afectar la expresión de los síntomas positivos por una regulación indirecta en los niveles de la dopamina a nivel central, sin embargo, es necesario profundizar en estudios para poder probar esta hipótesis **[125, 133]**.

En conclusión, nuestros estudios de asociación no demuestran una relación entre los alelos ApoE ϵ 4, ApoE-219G/T y COMT y pacientes con esquizofrenia, ni asociación de éstos con la gravedad de la sintomatología clínica y el deterioro cognitivo.

9.1.3 Estudio de Meta-análisis

La literatura sugiere que la estratificación poblacional, el tamaño de muestra y los criterios diagnósticos que definen a la muestra, contribuyen a la pérdida de la reproducibilidad en los estudios de asociación [100, 106], de tal manera que se han propuesto otro tipo de metodologías que eviten este tipo de problemas [108]. Unos de ellos son los métodos meta-analíticos, los cuales son poderosas herramientas que nos permiten analizar datos obtenidos de diversos estudios con tamaños de muestra pequeños y con bajo poder estadístico. Recientemente el uso de este tipo de estudios ha cobrado mayor importancia porque al agrupar los resultados se presenta mejor interpretación de los datos, por lo que en esta tesis se realizó un estudio de meta-análisis que incluyó los trabajos reportados hasta la fecha y nuestros datos de asociación del alelo ApoE ϵ 4 y esquizofrenia.

Los criterios de selección de los estudios que se incluirán en el análisis son muy importantes, ya que la información obtenida de los meta-análisis puede ser tomada como concluyente respecto al tema y a la vez abre la puerta a futuros estudios. El término meta-análisis se utilizó por primera vez en 1976 y define un proceso de análisis de datos publicados en estudios sobre un tópico en específico. Para realizar este tipo de estudios es muy importante, no sólo el tomar los datos

de los artículos publicados en la literatura sino además, realizar una cuidadosa selección de los datos, pues existen reportes basados en el mismo grupo de pacientes lo cual podría sesgar los resultados del meta-análisis al no analizar muestras independientes. En el presente trabajo se realizó un análisis cuidadoso de los datos, dado que se tomaron en cuenta todas las posibles variables que pudieran proporcionar falsos resultados. Los resultados no mostraron asociación entre el alelo $\epsilon 4$ de ApoE y esquizofrenia, apoyando reportes previos con muestras de menor tamaño (861 casos y 1843 controles) [69].

En el primer análisis el estudio mostró heterogeneidad, por lo que se procedió a la búsqueda de las causas, así como a la evaluación de la influencia de ésta en el estudio; en un segundo análisis, sólo se incluyeron los reportes dentro de la curva de homogeneidad y los resultados nuevamente no indicaron asociación del alelo $\epsilon 4$ de ApoE y esquizofrenia. De manera interesante, dos de los tres estudios que aportaban heterogeneidad en el análisis, fueron realizados en poblaciones de origen asiático.[101, 103]. Esta diferencia en la frecuencia alélica de ApoE en población asiática ya ha sido observada en el meta-análisis reportado por Schurhoff et al.[69] y en un reporte de Hallman et al.[157] por lo que se ha sugerido que el alelo $\epsilon 4$ de ApoE podría tener un efecto protector en esta población y no de riesgo como en la población caucásica [69]. Podemos concluir que el estudio de meta-análisis no apoya la asociación entre el alelo ApoE $\epsilon 4$ y esquizofrenia [108].

9.2 Estudio de asociación basado en familias

Hasta aquí se utilizaron dos diferentes metodologías para poder conocer cuál es el papel de ApoE y COMT en el desarrollo de la esquizofrenia, sin embargo dada la falta de reproducibilidad de los resultados es necesario la utilización de otro tipo de metodologías, como lo son los estudios de asociación basados en familias que podrían ayudar a aclarar el papel de estos locus en el desarrollo de la esquizofrenia [108].

Utilizando la metodología de asociación en presencia de ligamiento se investigo la asociación de las regiones, ApoE, ApoE-219G/T y COMT observando la frecuencias de alelos compartidos en los pares de hermanos con esquizofrenia.

La elección del programa APL para el análisis se debió porque su algoritmo se basa en la diferencia entre el número de copias observadas de un alelo específico en los hermanos afectados y las compara con el número esperado de copias condicionadas éstas por los genotipos de los padres, bajo la hipótesis nula de no ligamiento y no asociación en familias nucleares. Este programa se ajustó a las características de la muestra por que puede analizar familias con más de tres hermanos afectados y a la vez incluye en el análisis la cantidad de hermanos no afectados presentes en las familias, en esta muestra las familias fueron de distintos tipos (figuras 12 y 13). Una última razón para utilizarlo es porque el programa utiliza simulación con los datos y sus resultados son más informativos que los comparados con otros programas de su tipo como es FBAT y PDT porque reduce los falsos positivos [145].

Este es el primer estudio usando pares de hermanos afectados que investigó la región cromosómica 19q13.2 que contiene el gen de la ApoE. Se observó que en la población mexicana existe una asociación en presencia de ligamiento del alelo $\epsilon 3$ de ApoE, esto debido a que está presente un aumento en la probabilidad de transmisión de ApoE $\epsilon 3$ de los padres a los hijos afectados y una disminución de la transmisión de los alelos ApoE $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$, por lo que los resultados sugieren que ApoE $\epsilon 3$ puede ser un importante alelo de susceptibilidad para el desarrollo de la esquizofrenia [108].

Con base en este resultado, se decidió analizar la muestra de acuerdo al género y se observó que la asociación en presencia de ligamiento se pierde en el género masculino, sin embargo, en las mujeres ApoE $\epsilon 3$ contribuye al desarrollo de la esquizofrenia, porque la frecuencia observada es superior a la esperada ($p=0.003$) y como se puede observar el análisis de este grupo es estadísticamente significativo hacia este alelo, por lo que los resultados sugieren que en mujeres ApoE $\epsilon 3$ puede contribuir al desarrollo de la esquizofrenia. Esta asociación en presencia de ligamiento es un importante resultado, aunque, es necesaria la realización de futuros estudios con mayor número de familias para mostrar mayor poder estadístico.

De manera muy interesante, estos resultados presentan una baja transmisión de ApoE $\epsilon 2$ cuando se analiza la muestra total; un resultado similar se observó cuando se analizó únicamente por probandos y a la vez este se observó al realizar el análisis de la edad de inicio de la esquizofrenia. Tomados estos datos en su conjunto podrían sugerir que ApoE $\epsilon 2$ protege contra el desarrollo de la esquizofrenia. Sin embargo, por el pequeño tamaño de la muestra, este hallazgo

debe ser tomado con cautela. La influencia de ApoE ϵ 2 ha sido estudiada en diversos desórdenes neuropsiquiátricos, algunos reportes lo sitúan como un factor de protección al desarrollo del Alzheimer [158], mayor longevidad en pacientes con síndrome de Down [87], protección hacia el desarrollo de demencia [87] y protección contra el inicio temprano de la esquizofrenia [97]. Si bien, el mecanismo por el que ApoE pudiera estar participando en los diferentes procesos patogénicos, es aún desconocido [108].

Por otro lado, se conoce que la región promotora de ApoE contiene varios elementos que regulan la actividad de transcripción de ApoE [159]. A pesar que la región promotora de ApoE contiene varios polimorfismos, el único que se ha asociado con esquizofrenia es el polimorfismo ApoE-219G/T, por esto se incluyó en el análisis de asociación en presencia de ligamiento y se observó que en los hombres el alelo ApoE-219G es mayormente transmitido que el alelo ApoE-219T. Esto sugiere que el efecto de ApoE en esquizofrenia es tipo género-dependiente. En la literatura se ha propuesto que el polimorfismo ApoE -219G/T produce variaciones en la actividad transcripcional de ApoE en las células neuronales, mientras que el alelo G se le ha relacionado con mayor actividad transcripcional [160], lo que puede sugerir que ApoE puede tener un papel muy importante y específico en algunas patologías lo que abre la posibilidad a futuros estudios [108, 161, 162].

Para observar cómo participan los genes en el desarrollo de la esquizofrenia, se construyeron haplotipos de ApoE/ApoE-219. Se observó que el haplotipo más transmitido fue el ApoE ϵ 3/ApoE-219G, la mayor frecuencia de este haplotipo sólo fue observada en la muestra general, pero no se observó cuando se realizó el

análisis género-específico. Este haplotipo se ha asociado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y con niveles altos de colesterol sanguíneo [163, 164], por lo cual es necesario desarrollar estudios aumentando el número de familias.

Los resultados obtenidos del análisis de asociación en presencia de ligamiento sugieren que la variación alélica en el gen ApoE o en la región promotora podría estar participando en el desarrollo de la esquizofrenia. La importancia de estos resultados es que a pesar de existir estudios de asociación utilizando los genes analizados, no existen reportes utilizando la metodología de asociación en presencia de ligamiento. Este tipo de estudios debido a su diseño puede servir de base para abundar en el estudio de estos genes especialmente en la población mexicana ya que el aumento en la frecuencia de alelos compartidos revela que esta región podría estar participando en el desarrollo de la esquizofrenia.

Por otro lado, cuando se analizó el gen COMT no se observó asociación en presencia de ligamiento en ninguno de sus alelos, esto sugiere que COMT no es un factor de susceptibilidad al desarrollo de la esquizofrenia. Una de las limitantes de este estudio es su pequeño tamaño de muestra aunque el poder para detectar el efecto genético es aceptable. No fue posible con el número de familias analizadas observar el efecto de COMT, quizá porque el efecto que aporta a la susceptibilidad al desarrollo de la esquizofrenia es pequeño.

Aunque los resultados no aportan evidencia de COMT como factor de susceptibilidad al desarrollo de la esquizofrenia, esta región es de gran interés por lo que son necesarios futuros estudios con mayor tamaño de muestra que utilicen la metodología empleada en este estudio. Los estudios que utilizan familias en su

diseño como este, tienen mayor poder estadístico, porque reducen la estratificación poblacional y el error de falsos positivo con lo que el poder aumenta.

CONCLUSIONES

- En el estudio basado en familias se observó asociación con esquizofrenia de manera género dependiente en mujeres y que el haplotipo ApoE ϵ 3/ApoE -219G aumenta el riesgo para esquizofrenia en pares de hermanos afectados.
- En ambos estudios, basados en familias y en poblaciones, se observó que ApoE ϵ 2 podría tener un efecto protector en el desarrollo de la esquizofrenia en población mexicana.
- En los estudios basados en poblaciones, de casos-control y meta-analítico, se observó que el alelo ApoE ϵ 4 no se asocia con la esquizofrenia, ni con las características clínicas de la enfermedad.
- En todos los estudios realizados se observó que COMT no está asociado con la esquizofrenia ni con las características clínicas de la enfermedad.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Blanchard JJ and AS Cohen**, *The structure of negative symptoms within schizophrenia: implications for assessment*. Schizophr Bull, 2006. **32**(2): p. 238-45.
2. **Mueser KT and SR McGurk**, *Schizophrenia*. Lancet, 2004. **363**(9426): p. 2063-72.
3. **Hill JO, HR Wyatt, GW Reed, and JC Peters**, *Obesity and the environment: where do we go from here?* Science, 2003. **299**(5608): p. 853-5.
4. **Gottesman, II and A Bertelsen**, *Confirming unexpressed genotypes for schizophrenia. Risks in the offspring of Fischer's Danish identical and fraternal discordant twins*. Arch Gen Psychiatry, 1989. **46**(10): p. 867-72.
5. **Vargas ML**, *[The possibilities of neurocognitive rehabilitation in schizophrenia]*. Rev Neurol, 2004. **38**(5): p. 473-82.
6. **American, Psychiatric, and Association**, *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV*. 1994: p. xxvii, 886 p.
7. Association AP, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Fourth Edition ed, ed. American Psychiatric Association. 1994, Washington, DC.
8. **Poreh AM, K Chapin, MD Rosen, and I Youssef**, *Correlations between the MMPI and the Scale for the Assessment of Positive Symptoms and the Scale for the Assessment of Negative Symptoms in schizophrenic patients*. J Pers Assess, 1994. **63**(2): p. 275-83.
9. **Jablensky A**, *The concept of schizophrenia: pro et contra*. Epidemiol Psichiatr Soc, 1999. **8**(4): p. 242-7.
10. **Sartorius N, A Jablensky, and R Shapiro**, *Cross-cultural differences in the short-term prognosis of schizophrenic psychoses*. Schizophr Bull, 1978. **4**(1): p. 102-13.
11. *Schizophrenia: WHO study shows that patients fare better in developing countries*. WHO Chron, 1979. **33**(11): p. 428.
12. **Takei N, PB Mortensen, U Klaening, RM Murray, PC Sham, E O'Callaghan, et al.**, *Relationship between in utero exposure to influenza epidemics and risk of schizophrenia in Denmark*. Biol Psychiatry, 1996. **40**(9): p. 817-24.
13. **Thomas HV, C Dalman, AS David, J Gentz, G Lewis, and P Allebeck**, *Obstetric complications and risk of schizophrenia. Effect of gender, age at diagnosis and maternal history of psychosis*. Br J Psychiatry, 2001. **179**: p. 409-14.
14. **Cannon M, PB Jones, and RM Murray**, *Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review*. Am J Psychiatry, 2002. **159**(7): p. 1080-92.
15. **Bruce ML, DT Takeuchi, and PJ Leaf**, *Poverty and psychiatric status. Longitudinal evidence from the New Haven Epidemiologic Catchment Area study*. Arch Gen Psychiatry, 1991. **48**(5): p. 470-4.
16. **Wright IC, S Rabe-Hesketh, PW Woodruff, AS David, RM Murray, and ET Bullmore**, *Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia*. Am J Psychiatry, 2000. **157**(1): p. 16-25.
17. **Holguín J**, *Neurodesarrollo y esquizofrenia*. 2004, Bogota, Comlombia.

18. **Kuhl PK, KA Williams, F Lacerda, KN Stevens, and B Lindblom**, *Linguistic experience alters phonetic perception in infants by 6 months of age*. *Science*, 1992. **255**(5044): p. 606-8.
19. **Blakemore SJ and S Choudhury**, *Development of the adolescent brain: implications for executive function and social cognition*. *J Child Psychol Psychiatry*, 2006. **47**(3-4): p. 296-312.
20. **Blakemore SJ and S Choudhury**, *Brain development during puberty: state of the science*. *Dev Sci*, 2006. **9**(1): p. 11-4.
21. **Murray RM**, *Neurodevelopmental schizophrenia: the rediscovery of dementia praecox*. *Br J Psychiatry Suppl*, 1994(25): p. 6-12.
22. **Murray RM and SW Lewis**, *Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder?* *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1988. **296**(6614): p. 63.
23. **Walker J, V Curtis, and RM Murray**, *Schizophrenia and bipolar disorder: similarities in pathogenic mechanisms but differences in neurodevelopment*. *Int Clin Psychopharmacol*, 2002. **17 Suppl 3**: p. S11-9.
24. **Illi A, O Kampman, K Hanninen, S Anttila, KM Mattila, H Katila, et al.**, *Catechol-O-methyltransferase val108/158met genotype and response to antipsychotic medication in schizophrenia*. *Hum Psychopharmacol*, 2007. **22**(4): p. 211-5.
25. **Pitas RE, JK Boyles, SH Lee, D Foss, and RW Mahley**, *Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins*. *Biochim Biophys Acta*, 1987. **917**(1): p. 148-61.
26. **Mahley RW, BP Nathan, S Bellosta, and RE Pitas**, *Apolipoprotein E: impact of cytoskeletal stability in neurons and the relationship to Alzheimer's disease*. *Curr Opin Lipidol*, 1995. **6**(2): p. 86-91.
27. **Poirier J**, *Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease*. *Trends Neurosci*, 1994. **17**(12): p. 525-30.
28. **Mahley RW**, *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. *Science*, 1988. **240**(4852): p. 622-30.
29. **Diamond A**, *Evidence for the importance of dopamine for prefrontal cortex functions early in life*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1996. **351**(1346): p. 1483-93; discussion 1494.
30. **Jentsch JD, A Tran, D Le, KD Youngren, and RH Roth**, *Subchronic phencyclidine administration reduces mesoprefrontal dopamine utilization and impairs prefrontal cortical-dependent cognition in the rat*. *Neuropsychopharmacology*, 1997. **17**(2): p. 92-9.
31. **Gasparini M, E Fabrizio, V Bonifati, and G Meco**, *Cognitive improvement during Tolcapone treatment in Parkinson's disease*. *J Neural Transm*, 1997. **104**(8-9): p. 887-94.
32. **Byne W, MS Buchsbaum, LA Mattiace, EA Hazlett, E Kemether, SL Elhakem, et al.**, *Postmortem assessment of thalamic nuclear volumes in subjects with schizophrenia*. *Am J Psychiatry*, 2002. **159**(1): p. 59-65.
33. **Andreasen NC**, *Linking mind and brain in the study of mental illnesses: a project for a scientific psychopathology*. *Science*, 1997. **275**(5306): p. 1586-93.
34. **Buchsbaum MS, T Someya, CY Teng, L Abel, S Chin, A Najafi, et al.**, *PET and MRI of the thalamus in never-medicated patients with schizophrenia*. *Am J Psychiatry*, 1996. **153**(2): p. 191-9.

35. **Schultz SK and NC Andreasen**, *Schizophrenia*. Lancet, 1999. **353**(9162): p. 1425-30.
36. **Kendler KS, AM Gruenberg, and MT Tsuang**, *Psychiatric illness in first-degree relatives of schizophrenic and surgical control patients. A family study using DSM-III criteria*. Arch Gen Psychiatry, 1985. **42**(8): p. 770-9.
37. **McDonald C and KC Murphy**, *The new genetics of schizophrenia*. Psychiatr Clin North Am, 2003. **26**(1): p. 41-63.
38. **Cardno AG and Gottesman, II**, *Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics*. Am J Med Genet, 2000. **97**(1): p. 12-7.
39. **Daniels JK, NM Williams, J Williams, LA Jones, AG Cardno, KC Murphy, et al.**, *No evidence for allelic association between schizophrenia and a polymorphism determining high or low catechol O-methyltransferase activity*. American Journal of Psychiatry, 1996. **153**(2): p. 268-70.
40. **Farmer AE, P McGuffin, and Gottesman, II**, *Twin concordance for DSM-III schizophrenia. Scrutinizing the validity of the definition*. Arch Gen Psychiatry, 1987. **44**(7): p. 634-41.
41. **Onstad S, I Skre, S Torgersen, and E Kringlen**, *Twin concordance for DSM-III-R schizophrenia*. Acta Psychiatr Scand, 1991. **83**(5): p. 395-401.
42. **Tienari P**, *Interaction between genetic vulnerability and family environment: the Finnish adoptive family study of schizophrenia*. Acta Psychiatr Scand, 1991. **84**(5): p. 460-5.
43. **Oh G and A Petronis**, *Environmental studies of schizophrenia through the prism of epigenetics*. Schizophr Bull, 2008. **34**(6): p. 1122-9.
44. **Yoder JA, NS Soman, GL Verdine, and TH Bestor**, *DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe*. J Mol Biol, 1997. **270**(3): p. 385-95.
45. **Vaquero A, A Loyola, and D Reinberg**, *The constantly changing face of chromatin*. Sci Aging Knowledge Environ, 2003. **2003**(14): p. RE4.
46. **Kondo Y, L Shen, AS Cheng, S Ahmed, Y Bumber, C Charo, et al.**, *Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation*. Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 741-50.
47. **Kyle UG and C Pichard**, *The Dutch Famine of 1944-1945: a pathophysiological model of long-term consequences of wasting disease*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006. **9**(4): p. 388-94.
48. **Tremolizzo L, G Carboni, WB Ruzicka, CP Mitchell, I Sugaya, P Tueting, et al.**, *An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 17095-100.
49. **Chen Y, RP Sharma, RH Costa, E Costa, and DR Grayson**, *On the epigenetic regulation of the human reelin promoter*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(13): p. 2930-9.
50. **Berry N, V Jobanputra, and H Pal**, *Molecular genetics of schizophrenia: a critical review*. J Psychiatry Neurosci, 2003. **28**(6): p. 415-29.
51. **Gill M, H Vallada, D Collier, P Sham, P Holmans, R Murray, et al.**, *A combined analysis of D22S278 marker alleles in affected sib-pairs: support for a susceptibility locus for schizophrenia at chromosome 22q12*. Schizophrenia

- Collaborative Linkage Group (Chromosome 22)*. Am J Med Genet, 1996. **67**(1): p. 40-5.
52. **Levinson DF, P Holmans, RE Straub, MJ Owen, DB Wildenauer, PV Gejman, et al.**, *Multicenter linkage study of schizophrenia candidate regions on chromosomes 5q, 6q, 10p, and 13q: schizophrenia linkage collaborative group III*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(3): p. 652-63.
 53. **Escamilla MA, A Ontiveros, H Nicolini, H Raventos, R Mendoza, R Medina, et al.**, *A genome-wide scan for schizophrenia and psychosis susceptibility loci in families of Mexican and Central American ancestry*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2007. **144**(2): p. 193-9.
 54. **Brzustowicz LM, KA Hodgkinson, EW Chow, WG Honer, and AS Bassett**, *Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22*. Science, 2000. **288**(5466): p. 678-82.
 55. **Zhao X, R Tang, B Gao, Y Shi, J Zhou, S Guo, et al.**, *Functional variants in the promoter region of Chitinase 3-like 1 (CHI3L1) and susceptibility to schizophrenia*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(1): p. 12-8.
 56. **Blouin JL, BA Dombroski, SK Nath, VK Lasseter, PS Wolyniec, G Nestadt, et al.**, *Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21*. Nat Genet, 1998. **20**(1): p. 70-3.
 57. **Camp NJ, SL Neuhausen, J Tiobech, A Polloi, H Coon, and M Myles-Worsley**, *Genomewide multipoint linkage analysis of seven extended Palauan pedigrees with schizophrenia, by a Markov-chain Monte Carlo method*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(6): p. 1278-89.
 58. **Schwab SG, J Hallmayer, B Lerer, M Albus, M Borrmann, S Honig, et al.**, *Support for a chromosome 18p locus conferring susceptibility to functional psychoses in families with schizophrenia, by association and linkage analysis*. Am J Hum Genet, 1998. **63**(4): p. 1139-52.
 59. **Egan MF, TE Goldberg, BS Kolachana, JH Callicott, CM Mazzanti, RE Straub, et al.**, *Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6917-22.
 60. **Benmessaoud D, N Hamdani, C Boni, N Ramoz, M Hamon, F Kacha, et al.**, *Excess of transmission of the G allele of the -1438A/G polymorphism of the 5-HT2A receptor gene in patients with schizophrenia responsive to antipsychotics*. BMC Psychiatry, 2008. **8**: p. 40.
 61. **Wang Z, Y Fang, S Yu, C Yuan, W Hong, Z Yi, et al.**, *Susceptibility of schizophrenia and affective disorder not associated with loci on chromosome 6q in Han Chinese population*. Behav Brain Funct, 2007. **3**: p. 46.
 62. **Schindler KM, MT Pato, A Dourado, A Macedo, MH Azevedo, JL Kennedy, et al.**, *Association and linkage disequilibrium between a functional polymorphism of the dopamine-2 receptor gene and schizophrenia in a genetically homogeneous Portuguese population*. Mol Psychiatry, 2002. **7**(9): p. 1002-5.
 63. **Spielman RS and RM Weinshilboum**, *Genetics of red cell COMT activity: analysis of thermal stability and family data*. The American Journal of Medical Genetics, 1981. **10**(3): p. 279-90.
 64. **Hennah W, L Tomppo, T Hiekkalinna, OM Palo, H Kilpinen, J Ekelund, et al.**, *Families with the risk allele of DISC1 reveal a link between schizophrenia and*

- another component of the same molecular pathway, *NDE1*. *Hum Mol Genet*, 2007. **16**(5): p. 453-62.
65. **Malhotra AK, LJ Kestler, C Mazzanti, JA Bates, T Goldberg, and D Goldman**, *A functional polymorphism in the COMT gene and performance on a test of prefrontal cognition*. *Am J Psychiatry*, 2002. **159**(4): p. 652-4.
 66. **Williams NM, AG Cardno, KC Murphy, LA Jones, P Asherson, P McGuffin, et al.**, *Association between schizophrenia and a microsatellite polymorphism at the dopamine D5 receptor gene*. *Psychiatr Genet*, 1997. **7**(2): p. 83-5.
 67. **Muir WJ, ML Thomson, P McKeon, L Mynett-Johnson, C Whitton, KL Evans, et al.**, *Markers close to the dopamine D5 receptor gene (DRD5) show significant association with schizophrenia but not bipolar disorder*. *Am J Med Genet*, 2001. **105**(2): p. 152-8.
 68. **Lachman HM, DF Papolos, T Saito, YM Yu, CL Szumlanski, and RM Weinshilboum**, *Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders*. *Pharmacogenetics*, 1996. **6**(3): p. 243-50.
 69. **Schurhoff F, A Szoke, F Chevalier, I Roy, A Meary, F Bellivier, et al.**, *Schizotypal dimensions: an intermediate phenotype associated with the COMT high activity allele*. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics* 2007. **144B**(1): p. 64-8.
 70. **Lachman HM, J Kelsoe, L Moreno, S Katz, and DF Papolos**, *Lack of association of catechol-O-methyltransferase (COMT) functional polymorphism in bipolar affective disorder*. *Psychiatr Genet*, 1997. **7**(1): p. 13-7.
 71. **Frisch A, N Laufer, Y Danziger, E Michaelovsky, S Leor, C Carel, et al.**, *Association of anorexia nervosa with the high activity allele of the COMT gene: a family-based study in Israeli patients*. *Mol Psychiatry*, 2001. **6**(2): p. 243-5.
 72. **Meira-Lima I, RG Shavitt, K Miguita, E Ikenaga, EC Miguel, and H Vallada**, *Association analysis of the catechol-o-methyltransferase (COMT), serotonin transporter (5-HTT) and serotonin 2A receptor (5HT2A) gene polymorphisms with obsessive-compulsive disorder*. *Genes Brain Behav*, 2004. **3**(2): p. 75-9.
 73. **Payton A, J Holmes, JH Barrett, T Hever, H Fitzpatrick, AL Trumper, et al.**, *Examining for association between candidate gene polymorphisms in the dopamine pathway and attention-deficit hyperactivity disorder: a family-based study*. *Am J Med Genet*, 2001. **105**(5): p. 464-70.
 74. **Ohara K, M Nagai, K Tani, T Tsukamoto, and K Ohara**, *Schizophrenia and the serotonin-2A receptor promoter polymorphism*. *Psychiatry Res*, 1999. **85**(2): p. 221-4.
 75. **Gothert M, P Propping, H Bonisch, M Bruss, and MM Nothen**, *Genetic variation in human 5-HT receptors: potential pathogenetic and pharmacological role*. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. **861**: p. 26-30.
 76. **Serretti A, R Lilli, C Lorenzi, E Lattuada, C Cusin, and E Smeraldi**, *Serotonin transporter gene (5-HTTLPR) and major psychoses*. *Mol Psychiatry*, 2002. **7**(1): p. 95-9.
 77. **Shinkai T, O Ohmori, T Suzuki, H Kojima, H Hori, T Terao, et al.**, *Polymorphisms of tryptophan hydroxylase gene and the symptomatology of schizophrenia: an association study*. *Psychiatr Genet*, 2000. **10**(4): p. 165-71.

78. **Herken H and ME Erdal**, *Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia: evidence for association between symptomatology and prognosis*. Psychiatr Genet, 2001. **11**(2): p. 105-9.
79. **Eastwood SL, B McDonald, PW Burnet, JP Beckwith, RW Kerwin, and PJ Harrison**, *Decreased expression of mRNAs encoding non-NMDA glutamate receptors GluR1 and GluR2 in medial temporal lobe neurons in schizophrenia*. Brain Res Mol Brain Res, 1995. **29**(2): p. 211-23.
80. **Dracheva S, SA Marras, SL Elhakem, FR Kramer, KL Davis, and V Haroutunian**, *N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia*. Am J Psychiatry, 2001. **158**(9): p. 1400-10.
81. **Kaneshima M, T Higa, H Nakamoto, and M Nagamine**, *An association study between the Cys311 variant of dopamine D2 receptor gene and schizophrenia in the Okinawan population*. Psychiatry Clin Neurosci, 1997. **51**(6): p. 379-81.
82. **Dubertret C, P Gorwood, L Gouya, JC Deybach, and J Ades**, *Association and excess of transmission of a DRD2 haplotype in a sample of French schizophrenic patients*. Schizophr Res, 2001. **49**(1-2): p. 203-12.
83. **Devon RS and DJ Porteous**, *Physical mapping of a glutamate receptor gene in relation to a balanced translocation associated with schizophrenia in a large Scottish family*. Psychiatr Genet, 1997. **7**(4): p. 165-9.
84. **Weisgraber KH and RW Mahley**, *Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection*. Faseb J, 1996. **10**(13): p. 1485-94.
85. **Kampman O, S Anttila, A Illi, KM Mattila, R Rontu, E Leinonen, et al.**, *Apolipoprotein E polymorphism is associated with age of onset in schizophrenia*. J Hum Genet, 2004. **49**(7): p. 355-9.
86. **Benjamin R, A Leake, JA Edwardson, IG McKeith, PG Ince, RH Perry, et al.**, *Apolipoprotein E genes in Lewy body and Parkinson's disease*. Lancet, 1994. **343**(8912): p. 1565.
87. **Royston MC, D Mann, S Pickering-Brown, F Owen, R Perry, R Ragbavan, et al.**, *ApoE2 allele, Down's syndrome, and dementia*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **777**: p. 255-9.
88. **Amouyel P, O Vidal, JM Launay, and JL Laplanche**, *The apolipoprotein E alleles as major susceptibility factors for Creutzfeldt-Jakob disease*. The French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies. Lancet, 1994. **344**(8933): p. 1315-8.
89. **Farrer LA, CR Abraham, L Volicer, EJ Foley, NW Kowall, AC McKee, et al.**, *Allele epsilon 4 of apolipoprotein E shows a dose effect on age at onset of Pick disease*. Exp Neurol, 1995. **136**(2): p. 162-70.
90. **Harrington CR, M Roth, JH Xuereb, PJ McKenna, and CM Wischik**, *Apolipoprotein E type epsilon 4 allele frequency is increased in patients with schizophrenia*. Neurosci Lett, 1995. **202**(1-2): p. 101-4.
91. **Glatt SJ, SV Faraone, and MT Tsuang**, *Meta-analysis identifies an association between the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia*. Mol Psychiatry, 2003. **8**(11): p. 911-5.
92. **Durany N, P Riederer, and FF Cruz-Sanchez**, *Apolipoprotein E genotype in Spanish schizophrenic patients*. Psychiatr Genet, 2000. **10**(2): p. 73-7.

93. **Arnold SE, E Joo, MG Martinoli, N Roy, JQ Trojanowski, RE Gur, et al.,** *Apolipoprotein E genotype in schizophrenia: frequency, age of onset, and neuropathologic features.* Neuroreport, 1997. **8**(6): p. 1523-6.
94. **Schurhoff F, MO Krebs, A Szoke, JY Loze, C Goldberger, V Quignon, et al.,** *Apolipoprotein E in schizophrenia: a French association study and meta-analysis.* Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2003. **119**(1): p. 18-23.
95. **Lodoso Torrecilla, E. Palomo Atance, C. Camarena Grande, M.^oC. Díaz Fernández, L. Hierro Llanillo, A. de la Vega Bueno, et al.,** An Pediatr, 2006. **75**(1): p. 76-85.
96. **Joober R, G Rouleau, E Fon, S Lal, R Palmour, D Bloom, et al.,** *Apolipoprotein E genotype in schizophrenia.* Am J Med Genet, 1996. **67**(2): p. 235.
97. **Kimura T, S Yokota, R Igata-Yi, M Shono, J Takamatsu, and T Miyakawa,** *Apolipoprotein E epsilon2 allele and early onset schizophrenia.* Neurosci Lett, 1997. **231**(1): p. 53-5.
98. **Town T, D Fallin, F Crawford, S Walsh, R Solomon, and M Mullan,** *Lack of association between the apolipoprotein E epsilon4 allele (APOE epsilon4) and chronic schizophrenia.* Am J Med Genet, 1997. **74**(4): p. 451-2.
99. **Sorbi S, B Nacmias, A Tedde, S Latorraca, P Forleo, BM Guarnieri, et al.,** *No implication of apolipoprotein E polymorphism in Italian schizophrenic patients.* Neurosci Lett, 1998. **244**(2): p. 118-20.
100. **Martorell L, C Virgos, J Valero, G Coll, L Figuera, J Joven, et al.,** *Schizophrenic women with the APOE epsilon 4 allele have a worse prognosis than those without it.* Mol Psychiatry, 2001. **6**(3): p. 307-10.
101. **Li T, PC Sham, H Vallada, T Xie, X Tang, RM Murray, et al.,** *Preferential transmission of the high activity allele of COMT in schizophrenia.* Psychiatr Genet, 1996. **6**(3): p. 131-3.
102. **Pickar D, AK Malhotra, W Rooney, A Breier, and D Goldman,** *Apolipoprotein E epsilon 4 and clinical phenotype in schizophrenia.* Lancet, 1997. **350**(9082): p. 930-1.
103. **Chen JY, CJ Hong, HJ Chiu, CY Lin, YM Bai, HL Song, et al.,** *Apolipoprotein E genotype and schizophrenia.* Neuropsychobiology, 1999. **39**(3): p. 141-3.
104. **Han DH, BS Kee, KJ Min, YS Lee, C Na, DB Park, et al.,** *Effects of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism on the cognitive stability and aggression in the first-onset schizophrenic patients.* Neuroreport, 2006. **17**(1): p. 95-9.
105. **Moberg PJ, SE Arnold, DR Roalf, CC Balderston, J Abbazia, CG Kohler, et al.,** *Apolipoprotein E genotype and odor identification in schizophrenia.* J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2006. **18**(2): p. 231-3.
106. **Saiz PA, B Morales, GP MP, V Alvarez, E Coto, JM Fernandez, et al.,** *Apolipoprotein E genotype and schizophrenia: further negative evidence.* Acta Psychiatr Scand, 2002. **105**(1): p. 71-5.
107. **Thibaut F, A Van Der Elst, D Campion, C Martin, B Coron, S Dollfus, et al.,** *Apolipoprotein E-varepsilon4 frequency in deficit schizophrenia.* Eur Psychiatry, 1999. **14**(3): p. 148-51.
108. **Tovilla-Zarate C, B Camarena, R Apiquian, and H Nicolini,** *[Association study and meta-analysis of the apolipoprotein gene and schizophrenia].* Gaceta Medica de México, 2008. **144**(2): p. 79-83.

109. **Karoum F, SJ Chrapusta, and MF Egan**, *3-Methoxytyramine is the major metabolite of released dopamine in the rat frontal cortex: reassessment of the effects of antipsychotics on the dynamics of dopamine release and metabolism in the frontal cortex, nucleus accumbens, and striatum by a simple two pool model*. J Neurochem, 1994. **63**(3): p. 972-9.
110. **Sazci A, E Ergul, I Kucukali, G Kilic, G Kaya, and I Kara**, *Catechol-O-methyltransferase gene Val108/158Met polymorphism, and susceptibility to schizophrenia: association is more significant in women*. Brain Res Mol Brain Res, 2004. **132**(1): p. 51-6.
111. **Pelayo-Teran JM, B Crespo-Facorro, E Carrasco-Marin, R Perez-Iglesias, I Mata, MJ Arranz, et al.**, *Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and clinical characteristics in first episode non-affective psychosis*. American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics 2008. **147B**(5): p. 550-6.
112. **Lachman HM, DF Papolos, T Saito, YM Yu, CL Szumlanski, and RM Weinshilboum**, *Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders*. Pharmacogenetics and genomics, 1996. **6**(3): p. 243-50.
113. **Lotta T, J Vidgren, C Tilgmann, I Ulmanen, K Melen, I Julkunen, et al.**, *Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme*. Biochemistry, 1995. **34**(13): p. 4202-10.
114. **Joober R, J Gauthier, S Lal, D Bloom, P Lalonde, G Rouleau, et al.**, *Catechol-O-methyltransferase Val-108/158-Met gene variants associated with performance on the Wisconsin Card Sorting Test*. Arch Gen Psychiatry, 2002. **59**(7): p. 662-3.
115. **de Chaldee M, M Corbex, D Campion, M Jay, D Samolyk, M Petit, et al.**, *No evidence for linkage between COMT and schizophrenia in a French population*. Psychiatry Res, 2001. **102**(1): p. 87-90.
116. **Norton N, G Kirov, S Zammit, G Jones, S Jones, R Owen, et al.**, *Schizophrenia and functional polymorphisms in the MAOA and COMT genes: no evidence for association or epistasis*. American Journal of Medical Genetic, 2002. **114**(5): p. 491-6.
117. **Arinami T, T Ohtsuki, K Takase, H Shimizu, T Yoshikawa, H Horigome, et al.**, *Screening for 22q11 deletions in a schizophrenia population*. Schizophr Res, 2001. **52**(3): p. 167-70.
118. **Chen CH, YR Lee, MY Chung, FC Wei, FJ Koong, CK Shaw, et al.**, *Systematic mutation analysis of the catechol O-methyltransferase gene as a candidate gene for schizophrenia*. Am J Psychiatry, 1999. **156**(8): p. 1273-5.
119. **Karayiorgou M, JA Gogos, BL Galke, PS Wolynec, G Nestadt, SE Antonarakis, et al.**, *Identification of sequence variants and analysis of the role of the catechol-O-methyl-transferase gene in schizophrenia susceptibility*. Biol Psychiatry, 1998. **43**(6): p. 425-31.
120. **Kotler M, P Barak, H Cohen, IE Averbuch, A Grinshpoon, I Gritsenko, et al.**, *Homicidal behavior in schizophrenia associated with a genetic polymorphism determining low catechol O-methyltransferase (COMT) activity*. Am J Med Genet, 1999. **88**(6): p. 628-33.

121. **Liou YJ, SJ Tsai, CJ Hong, YC Wang, and IC Lai**, *Association analysis of a functional catechol-o-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenic patients in Taiwan*. Neuropsychobiology, 2001. **43**(1): p. 11-4.
122. **Ohmori O, T Shinkai, H Kojima, T Terao, T Suzuki, T Mita, et al.**, *Association study of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in Japanese schizophrenics*. Neurosci Lett, 1998. **243**(1-3): p. 109-12.
123. **Strous RD, N Bark, M Woerner, and HM Lachman**, *Lack of association of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia*. Biological Psychiatry, 1997. **41**(4): p. 493-5.
124. **Shifman S, M Bronstein, M Sternfeld, A Pisante-Shalom, E Lev-Lehman, A Weizman, et al.**, *A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia*. The American Journal of Human Genetics, 2002. **71**(6): p. 1296-302.
125. **Stefanis NC, J Van Os, D Avramopoulos, N Smyrnis, I Evdokimidis, I Hantoumi, et al.**, *Variation in catechol-o-methyltransferase val158 met genotype associated with schizotypy but not cognition: a population study in 543 young men*. Biol Psychiatry, 2004. **56**(7): p. 510-5.
126. **Gallinat J, M Bajbouj, T Sander, P Schlattmann, K Xu, EF Ferro, et al.**, *Association of the G1947A COMT (Val(108/158)Met) gene polymorphism with prefrontal P300 during information processing*. Biol Psychiatry, 2003. **54**(1): p. 40-8.
127. **Wang S, N Ray, W Rojas, MV Parra, G Bedoya, C Gallo, et al.**, *Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos*. PLoS Genet, 2008. **4**(3): p. e1000037.
128. **Inada T, A Nakamura, and Y Iijima**, *Relationship between catechol-O-methyltransferase polymorphism and treatment-resistant schizophrenia*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2003. **120**(1): p. 35-9.
129. **Kremer I, M Pinto, I Murad, M Muhaheed, I Bannoura, DJ Muller, et al.**, *Family-based and case-control study of catechol-O-methyltransferase in schizophrenia among Palestinian Arabs*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2003. **119**(1): p. 35-9.
130. **Kunugi H, HP Vallada, PC Sham, F Hoda, MJ Arranz, T Li, et al.**, *Catechol-O-methyltransferase polymorphisms and schizophrenia: a transmission disequilibrium study in multiply affected families*. Psychiatr Genet, 1997. **7**(3): p. 97-101.
131. **Rujescu D, I Giegling, A Gietl, AM Hartmann, and HJ Moller**, *A functional single nucleotide polymorphism (V158M) in the COMT gene is associated with aggressive personality traits*. Biol Psychiatry, 2003. **54**(1): p. 34-9.
132. **Bertolino A, G Caforio, V Petruzzella, V Latorre, V Rubino, S Dimalta, et al.**, *Prefrontal dysfunction in schizophrenia controlling for COMT Val158Met genotype and working memory performance*. Psychiatry Res, 2006. **147**(2-3): p. 221-6.
133. **Strous RD, R Lapidus, D Viglin, M Kotler, and HM Lachman**, *Analysis of an association between the COMT polymorphism and clinical symptomatology in schizophrenia*. Neuroscience Letters, 2006. **393**(2-3): p. 170-3.
134. **Bosco P, RM Gueant-Rodriguez, G Anello, RS Spada, A Romano, F Caraci, et al.**, *Allele epsilon 4 of APOE is a stronger predictor of Alzheimer risk in Sicily than in continental South Italy*. Neurosci Lett, 2005. **388**(3): p. 168-72.

135. **Campos-Sanchez R, R Barrantes, S Silva, M Escamilla, A Ontiveros, H Nicolini, et al.**, *Genetic structure analysis of three Hispanic populations from Costa Rica, Mexico, and the southwestern United States using Y-chromosome STR markers and mtDNA sequences*. Hum Biol, 2006. **78**(5): p. 551-63.
136. **Andreasen N**, *The Scale for the Assessment of Negative Symptoms (SANS)*. University of Iowa, 1983.
137. **Andreasen N**, *The Scale for the Assessment of Positive Symptoms (SAPS)*. University of Iowa, 1984.
138. **Folstein MF, SE Folstein, and PR McHugh**, "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res, 1975. **12**(3): p. 189-98.
139. **DeLisi LE**, *The significance of age of onset for schizophrenia*. Schizophrenia Bulletin, 1992. **18**(2): p. 209-15.
140. **Psychiatry AAoCaA, AACAP official action**. Summary of the practice parameters for the assessment and treatment of children and adolescents with schizophrenia. American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2000. **39**(12): p. 1580-2.
141. **Escamilla M, E Hare, AM Dassori, JM Peralta, A Ontiveros, H Nicolini, et al.**, *A Schizophrenia Gene Locus on Chromosome 17q21 in a New Set of Families of Mexican and Central American Ancestry: Evidence From the NIMH Genetics of Schizophrenia in Latino Populations Study*. American Journal Psychiatry, 2009.
142. **Lahiri DK and JI Nurnberger, Jr.**, *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5444.
143. **Wenham PR, WH Price, and G Blandell**, *Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR*. Lancet, 1991. **337**(8750): p. 1158-9.
144. **Leandro G**, *Meta-analysis in medical research: the handbook for the understanding and practice of meta-analysis*. Vol. 1. 2006, Massachusetts, USA: Blackwell Publishing Ltd. 98.
145. **Chung RH, RW Morris, L Zhang, YJ Li, and ER Martin**, *X-APL: an improved family-based test of association in the presence of linkage for the X chromosome*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(1): p. 59-68.
146. **Stephens M and P Donnelly**, *A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(5): p. 1162-9.
147. **Cruz-Fuentes CS, BZ Gonzalez-Sobrinho, A Gomez-Sanchez, H Martinez Rueda, RA Chavez-Eakle, and C Serrano Sanchez**, *Distribution of apolipoprotein E alleles in coras and huicholes from Nayarit and Nahuas and Mestizos from Veracruz, Mexico*. Hum Biol, 2005. **77**(6): p. 867-72.
148. **Perez-Tur J, D Campion, M Martinez, A Brice, S Tardieu, D Hannequin, et al.**, *Evidence for apolipoprotein E epsilon 4 association in early-onset Alzheimer's patients with late-onset relatives*. Am J Med Genet, 1995. **60**(6): p. 550-3.
149. **Molero P, F Ortuno, M Zalacain, and A Patino-Garcia**, *Clinical involvement of catechol-O-methyltransferase polymorphisms in schizophrenia spectrum disorders: influence on the severity of psychotic symptoms and on the response to neuroleptic treatment*. The Pharmacogenomics Journal, 2007. **7**(6): p. 418-26.

150. **Shinkai T, O Ohmori, H Kojima, T Terao, T Suzuki, K Abe, et al.,** *Apolipoprotein E regulatory region genotype in schizophrenia.* *Neurosci Lett*, 1998. **256**(1): p. 57-60.
151. **Rybakowski JK, A Borkowska, PM Czerski, M Dmitrzak-Weglarz, M Skibinska, P Kapelski, et al.,** *Performance on the Wisconsin Card Sorting Test in schizophrenia and genes of dopaminergic inactivation (COMT, DAT, NET).* *Psychiatry Res*, 2006. **143**(1): p. 13-9.
152. **Williams HJ, B Glaser, NM Williams, N Norton, S Zammit, S MacGregor, et al.,** *No association between schizophrenia and polymorphisms in COMT in two large samples.* *Am J Psychiatry*, 2005. **162**(9): p. 1736-8.
153. **Chen CH, YR Lee, FC Wei, FJ Koong, HG Hwu, and KJ Hsiao,** *Association study of NlaIII and MspI genetic polymorphisms of catechol-O-methyltransferase gene and susceptibility to schizophrenia.* *Biol Psychiatry*, 1997. **41**(9): p. 985-7.
154. **Wonodi I, OC Stine, BD Mitchell, RW Buchanan, and GK Thaker,** *Association between Val108/158 Met polymorphism of the COMT gene and schizophrenia.* *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 2003. **120B**(1): p. 47-50.
155. **Ohmori O, T Shinkai, H Kojima, T Terao, T Suzuki, T Mita, et al.,** *Association study of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in Japanese schizophrenics.* *Neuroscience Letters*, 1998. **243**(1-3): p. 109-12.
156. **Bryson G and MD Bell,** *Initial and final work performance in schizophrenia: cognitive and symptom predictors.* *J Nerv Ment Dis*, 2003. **191**(2): p. 87-92.
157. **Hallman DM, E Boerwinkle, N Saha, C Sandholzer, HJ Menzel, A Csazar, et al.,** *The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations.* *Am J Hum Genet*, 1991. **49**(2): p. 338-49.
158. **Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Collaborative Group.** *Lancet*, 1993. **342**(8873): p. 737-8.
159. **Artiga MJ, MJ Bullido, I Sastre, M Recuero, MA Garcia, J Aldudo, et al.,** *Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene.* *FEBS Lett*, 1998. **421**(2): p. 105-8.
160. **Ramos MC, S Matias, MJ Artiga, J Pozueta, I Sastre, F Valdivieso, et al.,** *Neuronal specific regulatory elements in apolipoprotein E gene proximal promoter.* *Neuroreport*, 2005. **16**(9): p. 1027-30.
161. **Brecht WJ, FM Harris, S Chang, I Tesseur, GQ Yu, Q Xu, et al.,** *Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice.* *J Neurosci*, 2004. **24**(10): p. 2527-34.
162. **Aoki K, T Uchihara, N Sanjo, A Nakamura, K Ikeda, K Tsuchiya, et al.,** *Increased expression of neuronal apolipoprotein E in human brain with cerebral infarction.* *Stroke*, 2003. **34**(4): p. 875-80.
163. **Viiri LE, A Loimaala, A Nenonen, S Islam, I Vuori, PJ Karhunen, et al.,** *The association of the apolipoprotein E gene promoter polymorphisms and haplotypes with serum lipid and lipoprotein concentrations.* *Atherosclerosis*, 2005. **179**(1): p. 161-7.
164. **Viiri LE, OT Raitakari, H Huhtala, M Kahonen, R Rontu, M Juonala, et al.,** *Relations of APOE promoter polymorphisms to LDL cholesterol and markers of subclinical atherosclerosis in young adults.* *J Lipid Res*, 2006. **47**(6): p. 1298-306.

11 ANEXO 1: ARTICULOS PUBLICADOS

1. Tovilla-Zarate C, Camarena B, Fresan Ay cols., : Apoe-E3 and Apoe-219g Haplotypes Increase the Risk for Schizophrenia in Sib Pairs. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 2008, en prensa
2. Tovilla-Zarate C, Camarena B, Apiquian Ry cols. : [Association Study and Meta-Analysis of the Apolipoprotein Gene and Schizophrenia]. *Gac Med Mex*, 144 (2):79-83, 2008
3. Tovilla-Zarate C, Camarena B, Nicolini H: El Papel Del Gen De La Apolipoproteina E En El Dearrollo De La Esquizofrenia. *Revisiones de Pediatria; Neurogenetica*, 6 (1):59-64, 2008

ApoE-ε3 and ApoE-219G haplotypes increase the risk for schizophrenia in sib pairs

1822 words
1 table with 82 words
Tel. (52) 5556113028
nicolini_humberto@yahoo.com

Tovilla-Zarate C,¹ Ph. D. Student, Camarena Medellin B,² Ph. D Student, Fresan A,² Ph. D., Apiquian Rogelio,³ Ph. D., Dassori Albana,⁴ Ph. D., Medina Rolando,⁴ M. D., Escamilla Michael,⁴ Ph. D., Nicolini H,^{1,3} Ph. D.

¹Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Escuela de Ciencias Genómicas, México D. F., México

²Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Depto. Genética Psiquiátrica, México, D. F., México.

³Grupo de Estudios Médicos y Familiares Carracci.

⁴Department of Psychiatry, University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSCSA), San Antonio, Texas,

Address correspondence to Dr. Humberto Nicolini, Grupo Médico Carracci, Carracci 107, Col. Insurgentes Extremadura, México D.F., 13740, México, D.F., México. Teléfono (55)5611-3028, Fax: (55)5611-3028, E-mail: nicolini_humberto@yahoo.com

ACKNOWLEDGEMENTS

Data and biomaterials used in this research report were collected by the International Neuro-Genetics Association of Spanish America and the United States (INGASU), and funded by a collaborative NIMH grant (Genetics of Schizophrenia in Latino Populations) to Dr. Michael Escamilla (MH60881) and to Dr. Ricardo Mendoza (MH60875).

Key Words: *Schizophrenia, Association, Allelic-Sharing, ApoE*

ABSTRACT

To investigate the role of the ApoE gene in schizophrenia, we analyzed 60 families with this mental disorder. An association in the presence of linkage test (APL) and haplotypes analysis were undertaken using the APL v1.1 software. A global allelic transmitted was significant for ApoE ϵ 3 ($\chi^2=6.24$, $p=0.01$); this allele is mainly carried by female patients ($\chi^2=8.33$, $p=0.003$), whereas ApoE-219G is preferentially transmitted in males ($p=0.02$). Furthermore, our results show that haplotypes ApoE ϵ 3/ApoE219G are associated with schizophrenia ($\chi^2=11.61$, $p=0.01$). These results provide evidence that the ApoE gene may play a significant role in the etiology of schizophrenia in the Mexican population.

INTRODUCTION

Schizophrenia is a complex disorder characterized by disturbed patterns of thought, feelings and behavior with a lifetime risk of 1%.¹ Several family, twin and adoption studies have demonstrated an important genetic contribution in its etiology.

In the last several years, a number of studies have suggested that the ApoE gene is associated with this disorder. Apolipoprotein E is a 34-kDa protein encoded by a gene on human chromosome 19q13.2. The ApoE gene has three introns and four exons; it is polymorphic, with three common alleles designated $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, and $\epsilon 4$ coding for three common isoforms which differ by one or two amino acids. Changes of two single nucleotides in the ApoE gene at positions 334 and 472 together with the combinations 334T/472T, 334T/472C, and 334C/472C constitute the known isoform-specific ApoE alleles: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, and $\epsilon 4$, respectively.²

ApoE is synthesized and secreted in the liver, brain, and skin tissues. In the central nervous system, ApoE is synthesized in astrocytes and oligodendrocytes; it is thought to play a role in neural growth and repair.^{3,4}

Recently, ApoE $\epsilon 4$ has been implicated as a risk factor for Alzheimer's disease (AD)^{5, 6} and has been correlated with an earlier age of onset of this illness.⁷

Moreover, an association between ApoE and cognitive decline in elderly adults has been reported.⁸ Evidence suggests that the ApoE genotype may influence the phenotype of several neuropsychiatric illnesses when combined with other factors in a variety of disorders.⁹

In 1995, Harrington et al.¹⁰ reported an increased $\epsilon 4$ allele frequency of the ApoE gene in 62 patients with schizophrenia. However, our study¹¹ together with other

reports demonstrated no association among ApoE genotypes and schizophrenia.¹¹⁻

¹⁵ Since 1995, growing interest on this issue prompted a variety of studies in Caucasian and Asian populations dealing with ApoE polymorphism and schizophrenia, though no conclusive outcomes were attained.¹⁶ To date, no association has been established between the ApoE gene and this mental disorder in the Mexican population.

On the other hand, in 1998, Artiga et al.¹⁷ found allelic polymorphism in the transcriptional regulatory region of the ApoE gene. This region is very important because it can have a functional repercussion mediated by the regulation of ApoE transcription. Nevertheless, only few reports have analyzed the association of this regulatory region and schizophrenia.

In this work, we determined the association of the genotypes ApoE and ApoE - 219G/T promoter polymorphisms with schizophrenia in sib-pair families.

METHODS

Subjects

Sixty sib-pairs with schizophrenia from families living in Mexico City participated in this study. These families fulfilled the inclusion criteria of: 1) having at least two siblings affected with this disorder, and 2) descending from Mexican parents and grandparents. All patients participating in the study gave written consent to this effect. All patients were evaluated by a trained psychiatrist using the Diagnostic Interview for Genetic Studies (DIGS), validated in Spanish. Besides, the sample in this study forms part of a multicenter linkage project.¹⁸

ApoE genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a modified version of the protocol from Lahiri,¹⁹ and amplified using the polymerase chain reaction (PCR) assay reported by Wenham et al.²⁰ The PCR products were digested with *CfoI* and the fragments separated by electrophoresis on a 10% polyacrilamide gel, stained with ethidium bromide, and visualized under ultraviolet illumination.

ApoE -219G/T (rs405509) genotyping

The final volume of the PCR reaction was 5 µL and consisted of 20 ng of genomic DNA, 2.5µL of TaqMan Master Mix, and 0.125µL of 20x Assay made to order. The amplification was performed in 96-well plates using the TaqMan Universal Thermal Cycling Protocol. After the PCR end-point was reached, fluorescence intensity was measured with the 7500 real time PCR system with SDS v2.1 software (Applied Biosystems). An allelic discrimination was performed resulting in the clear identification of three genotypes for ApoE -219G/T polymorphism. All genotyping was performed blind to patient's outcome. As a quality control in our genotyping analyses we used random blind duplicates.

Statistical Methods

The difference in allele frequencies between parents and affected siblings was compared and analyzed by the statistical package APL software v.1.1 (program viable from <http://www.chg.duke.edu/research/software.html>).²¹ This program is

based on the difference between the observed number of copies of a specific allele in affected siblings and the expected number of copies conditional on parental genotypes under the null hypothesis, which proposes no association or linkage in nuclear families. This program adjusts to the characteristics of our sample since it can analyze families with up to three affected siblings and arbitrary numbers of unaffected siblings. The simulations generated for the APL program has been showed that APL is more powerful than FBAT and PDT methods.²¹

Given that disease loci can have different effects on males and females, we performed separate testing for males and females, because APL may be more powerful and informative for sex-specific effects.²¹ We explored the relationship between ApoE alleles and age of onset of schizophrenia. APL analysis was performed using separate test for early onset (at age ≤ 18 years) and late onset families.²¹ Bonferroni's correction was applied for multiple testing (level of significance was set to $\alpha < 0.05/2 = 0.025$).

Haplotype construction

Haplotype analysis was performed with the ApoE and -219G/T polymorphisms using the PHASE program (version 2.0.2). Finally the subjects were categorized in distinct sharing haplotypes in best pairs.²²

RESULTS

Significant differences in allelic sharing were found for allele $\epsilon 3$ in the general sample ($\chi^2=6.24$, $p=0.01$); this was mainly observed in female patients ($\chi^2=8.33$, $p=0.003$). For allele $\epsilon 2$ ($p=0.04$) and $\epsilon 4$ ($p=0.09$) no significant differences were observed. When the results of allelic sharing for ApoE -219G/T were summarized, no differences between frequencies of the transmitted and nontransmitted allele were seen in the general sample. However, a suggested association was encountered in the male group ($p=0.02$). Finally, Table 1 presents the results of haplotype analysis. Higher frequencies of haplotypes ApoE- $\epsilon 3$ /ApoE -219G were found in the general group ($\chi^2=11.61$, $p=0.01$). However, no differences were encountered in the female ($p=0.18$) and male groups ($p=0.13$).

Finally, APL analysis of age of onset (late and early groups), did not show significant differences for the allele transmission of ApoE. However, we observed a lower allele transmission of ApoE $\epsilon 2$ in the early onset families ($p=0.02$).

Analysis of ApoE -219G/T did not show statistical differences associated with the age of onset (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we investigated the association in the presence of linkage among ApoE and ApoE -219G/T polymorphisms and schizophrenia by assessing the frequencies of transmitted and nontransmitted haplotype combinations. We observed that subjects carrying the ApoE $\epsilon 3$ /ApoE -219G combination showed a higher frequency of this transmitted haplotype than noncarriers. An association in the presence of linkage for ApoE $\epsilon 3$ and schizophrenia was found in female

patients, the same happened for ApoE -219G and this mental disorder in the male group.

To our knowledge this is the first study correlating the ApoE gene and schizophrenia in sib pairs. The ApoE gene has been previously associated with schizophrenia in case-control association studies,^{9, 10} with the outcome that this gene may modulate the age of onset of this disease.²³ A gender specific association was established between female carriers of ApoE ϵ 4 and an early onset of schizophrenia.²⁴ However, all related reports in the literature on this issue were derived from population-based case-control studies, which can be mistaken for stratification problems. Family-based studies are robust for population stratification. Nevertheless, we found no family-based studies in the literature correlating ApoE and schizophrenia. Therefore, we decided to test the ApoE locus by the method of association in the presence of linkage analysis in a sample of Mexican families. As a result, we found that ApoE ϵ 3 was associated with schizophrenia. In view of the increased probability of transmission of the ApoE ϵ 3 from parents to affected offspring and a decreased transmission of alleles ApoE ϵ 2 and ϵ 4, we conclude that ApoE ϵ 3 may be an important susceptibility allele for schizophrenia. The analysis of the female results showed that this group exhibited a marked statistical significance for this allele. Our results suggest that in females the ApoE ϵ 3 allele could contribute to the risk for schizophrenia. This sex-linked association is relevant, although further studies are necessary in which the number of families is increased. Interestingly, our findings showing a lower allele transmission of ApoE ϵ 2 in total sample and in the analysis of early age of onset may be suggest that ApoE ϵ 2 protects against the development of schizophrenia.

However, in view of the small sample size, these results must be taken with caution because the families were further subdivided by age of onset of schizophrenia. The influence of ApoE ϵ 2 has been investigated in neuropsychiatric disorders. It has been suggested that the possession of the ApoE ϵ 2 is associated with late onset of Alzheimer's,²⁵ longevity in Down's syndrome,²⁶ protection from the development of dementia,²⁷ and protection against early onset of schizophrenia.²⁸ Although the mechanism by which ApoE participates in the different pathogenic processes remains to be elucidated.

The ApoE promoter has been characterized and contains a number of important regulatory elements participating in gene transcription activity.¹⁷ ApoE -219G/T polymorphism located on 5'-flanking region has been associated with variations with gene transcriptional activity.¹⁷ It was reported a negative association between ApoE -219G/T and schizophrenia.²⁹ Our analysis observed an association between ApoE -219G and male schizophrenic patients ($p=0.02$).

The ApoE -219G/T polymorphism has been shown to produce variations in ApoE transcriptional activity in neural cells, where the G allele has been related to higher activity,³⁰ suggesting that ApoE could have a specific role in some pathological conditions.^{31, 32}

To our knowledge, there are no previous studies analyzing ApoE -219G/T/ApoE haplotypes in schizophrenia. Mexican schizophrenic patient showed a preferential transmission of ApoE ϵ 3/ApoE -219G haplotype. We did not find differences linked to gender because a limitation of our study was the small sample size. Therefore, future studies in a larger sample size is important to determine whether ApoE

$\epsilon 3/\text{ApoE} -219\text{G}$ haplotype play an etiological role in the susceptibility to schizophrenia or it is associated with gender differences.

Recently, a genome-wide scan in Latino population from the U.S.A., Mexico, Guatemala and Costa Rica included 99 sib-pair families diagnosed with schizophrenia.¹⁸ The study reported significant evidence of linkage on chromosome 1pter-p36 and suggestive linkage on chromosome, 18p11 and 5q32. However, did not show linkage for the ApoE region.¹⁸ The present study included only Mexico City sample. This selection may decrease genetic heterogeneity which in turn may increase statistical power if one is studying a polymorphism in a particular population.³³

CONCLUSION

Our results showed a preferential transmission of ApoE $\epsilon 3/\text{ApoE} -219\text{G}$ haplotype in sib-pairs affected with schizophrenia. Also, we observed a lower transmission of ApoE $\epsilon 2$ allele in schizophrenic patients with an early age of onset, suggesting a protective effect in the development of schizophrenia in Mexican population.

Future studies must analyze whether the association of this gene with schizophrenia can be replicated in larger samples of Mexican families suffering from this mental disorder.

Estudio de asociación y metaanálisis del gen de la apolipoproteína E y esquizofrenia

Carlos Tovilla-Zárate,^a Beatriz Camarena,^b Rogelio Apiquian^c y Humberto Nicolini^{a,*}

^aEscuela de Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México D.F., México

^bDepartamento de Genética Psiquiátrica, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", México D.F., México

^cCentro de Estudios Médicos y Familiares Carracci, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 9 de noviembre de 2007

Aceptado: 16 de noviembre de 2007

RESUMEN

Antecedentes: La esquizofrenia es una enfermedad mental cuyas causas etiológicas son desconocidas. Los estudios de epidemiología genética, de asociación y de ligamiento, han sugerido la presencia de factores genéticos involucrados en el desarrollo de la esquizofrenia. Existen numerosos estudios dirigidos a comprender la participación del gen de la apolipoproteína E (ApoE) en la esquizofrenia, sin embargo, los resultados son controversiales por la falta de replicación de los hallazgos.

Objetivo: Para conocer el efecto del alelo $\epsilon 4$ de ApoE en esquizofrenia, se analizó la frecuencia de genotipos y alelos de ApoE en pacientes de origen mexicano.

Resultados y conclusiones: No observamos diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con esquizofrenia comparados con el grupo control en las frecuencias por alelos ($\chi^2=0.94$, $df=2$, $p=0.62$) ni por genotipos ($\chi^2=1.02$, $df=2$, $p=0.59$). Finalmente, el metaanálisis de 19 estudios de asociación, incluyendo el presente estudio, mostró que el alelo de riesgo $\epsilon 4$ de ApoE no está asociado con el desarrollo de la esquizofrenia (OR=1.04, IC 95%=0.90-1.21, $p=0.184$), sin la presencia de heterogeneidad ($\chi^2=18.8$, $df=18$, $p=0.4$).

Palabras clave:

Esquizofrenia, asociación, metaanálisis, ApoE, polimorfismo

SUMMARY

Background: Schizophrenia is a mental disorder of unknown etiology. Epidemiological, association and linkage studies suggest the presence of genetic factors in the development of this disorder. Numerous studies have been undertaken to gain insight on the role of the ApoE gene in schizophrenia. However, findings remain controversial.

Objective: The current study analyzed the ApoE gene among schizophrenic patients of Mexican origin.

Results and conclusions: No significant differences were found in the distribution of alleles ($\chi^2=0.94$, $df=2$, $p=0.62$), or genotypes ($\chi^2=1.02$, $df=2$, $p=0.59$). The meta-analysis comprising 19 association studies (including the present one) showed that the risk allele $\epsilon 4$ of ApoE is not associated with the development of schizophrenia (OR 1.04, CI 95%=0.90-1.21, $p=0.184$) in the absence of heterogeneity ($\chi^2=18.8$, $df=18$, $p=0.4$).

Key words:

Schizophrenia, association, meta-analysis, ApoE gene, polymorphism

Introducción

La esquizofrenia es una enfermedad que afecta a 1% de la población mundial,¹ considerándose un desorden común, severo e incapacitante. Con base en estudios de familia, de gemelos y de adopción, se ha sugerido que factores genéticos desempeñan un papel fundamental en la etiología de la esquizofrenia.² Otros hallazgos que apoyan lo anterior son los estudios de ligamiento y de asociación, que han sugerido diversas regiones cromosómicas y genes candidatos involucrados en el desarrollo de la esquizofrenia.

Uno de los genes candidatos es la apolipoproteína E (ApoE), localizado en la región cromosomal 19q13.2. Se han

identificados diversos polimorfismos, uno de los cuales es el caracterizado por el cambio de una base en las posiciones 334 y 472, produciendo las combinaciones 334T/472T, 334T/472C y 334C/472C, que constituyen los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, y $\epsilon 4$ respectivamente, definiendo seis genotipos $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$.³

La ApoE es una proteína de 34 kDa, presente en las lipoproteínas del plasma y fluidos del cuerpo comprometidos en la redistribución de lípidos en las células. En el sistema nervioso central, la ApoE es sintetizada y secretada principalmente por astrocitos y macrófagos. Es la principal apolipoproteína expresada en el cerebro, en el líquido cefalorraquídeo y en membranas mielínicas.^{4,5} Se sugiere que las diferentes isoformas de ApoE pueden afectar de diferente

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Humberto Nicolini. Grupo Médico Carracci, Carracci 107, Col. Insurgentes Extremadura, 13740 México, D.F., México. Tel.: (55) 5611 3028. Fax: (55) 5611 3028. Correo electrónico: alfonso_tovillaz@yahoo.com

EL PAPEL DEL GEN DE LA APOLIPROTEÍNA E EN EL DESARROLLO DE LA ESQUIZOFRENIA

Tovilla-Zarate C¹, Beatriz Camarena², Humberto Nicolini^{1*}

Resumen

La esquizofrenia es una enfermedad con etiología no conocida. Existe evidencia de que factores genéticos principalmente participan en la etiología de la esquizofrenia, unidos a factores medioambientales. En años recientes con base en estudios de epidemiología genética, de asociación y de ligamiento se han estudiado diversos genes que se piensa que se encuentran involucrados en el desarrollo de la esquizofrenia. Se sugiere que el gen de la Apolipoproteína E (ApoE) aporta un factor de riesgo para algunas enfermedades con deterioro cognitivo. Existen numerosos estudios dirigidos a comprender la participación de la ApoE en la esquizofrenia, sin embargo, los resultados son controversiales por la falta de replicación. En este trabajo consideramos la evidencia en su conjunto, analizando nuestros resultados y las posibles causas en las discrepancias en los resultados y proponemos la necesidad de dirigir estudios que permitan entender con mayor precisión el papel de la ApoE en la esquizofrenia.

Palabras clave: Esquizofrenia, Asociación, Apolipoproteína E

Introducción

La esquizofrenia es una enfermedad mental que afecta a cerca del 1% de la población en el mundo, es un desorden común, severo e incapacitante. La etiología de la enfermedad no está descrita, sin embargo, estudios de familias, de gemelos y de adopción presentan evidencia de que factores genéticos contribuyen al desarrollo de la esquizofrenia. Mediante estudios de ligamiento y de asociación se ha tratado de encontrar genes y regiones del genoma que estén implicados en la etiología de esta enfermedad. Estudios

genéticos han sugerido que los pacientes portadores de por lo menos una copia del alelo $\epsilon 4$ del gen de la ApoE, presentan mayor susceptibilidad al desarrollo de la esquizofrenia, además de que este alelo, pudiera estar asociado a una disminución en la edad de inicio de la enfermedad. En la literatura se encuentran numerosos estudios dirigidos a analizar la participación del gen de la ApoE en la esquizofrenia; algunos reportes presentan asociación positiva del alelo $\epsilon 4$ del gen de ApoE y la esquizofrenia, sin embargo, en la mayoría de las publicaciones se observa asociación negativa. Al evaluar las características clínicas de los pacientes los resultados son controversiales. Por lo tanto, el propósito de este estudio es hacer una crítica sobre las posibles causas en las discrepancias de los resultados y considerar la necesidad de la realización de distintos tipos de estudios que estén dirigidos a examinar el papel del gen de la ApoE en la esquizofrenia y el efecto de este sobre las características clínicas de los pacientes con esta enfermedad.

Esquizofrenia

A pesar de que la etiología de este desorden no está descrita, estudios genéticos han demostrado que este padecimiento podría estar influenciado por factores genéticos, dado que el riesgo de sufrir la enfermedad es mayor en familiares de los pacientes que en el resto de la población, es decir, sus hermanos e hijos tienen mayor riesgo (9 al 13%) que sus familiares de segundo (4-6%) o tercer grado (2-5%) (1). La esquizofrenia es una enfermedad mental que se caracteriza principalmente por síntomas psicóticos, síntomas negativos y daño cognitivo. Los síntomas psicóticos consisten en la pérdida de contacto con la realidad, como creencias falsas (delirios) y experiencias perceptuales no experimentadas por otros (alucinaciones). Los delirios más comunes que presentan los pacientes son: persecución, control, grandiosidad y somáticas. Respecto a las alucinaciones también se presentan de diferentes tipos: visuales, auditivas, olfativas, gustativas y táctiles, las más comunes son las alucinaciones auditivas. Por otro lado, los síntomas negativos son un estado de déficit, el término se usa para describir una reducción en una variedad de conductas con respecto a una conducta hipotéticamente "normal". Las emociones básicas y los procesos conductuales están disminuidos o ausentes (empobrecimiento o disminución del pensamiento, de la afectividad, conducta y del lenguaje) (2).

* 1. Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Escuela de Ciencias Genómicas, México, D.F., México.
2. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Depto. Genética Psiquiátrica, México, D.F., México
M. en C. Tovilla-Zarate C es alumno del posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México
M. en C. Beatriz Camarena es Investigadora del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz
Dr. Humberto Nicolini es profesor investigador de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México
Correspondencia: Dr. Humberto Nicolini, Grupo Médico Carracci, Carracci 107, Col. Insurgentes Extremadura, México D.F., 13740, México, D.F., México. Teléfono (55)5611-3028, Fax: (55)5611-3028, E-mail: nicolini_humberto@yahoo.com the use of alternative methodologies to clarify the role of ApoE gene in schizophrenia. Keywords: Schizophrenia, Association, Apolipoprotein E, Gen.

12 ANEXO 2: PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES

INTERNACIONALES

Tovilla-Zarate C.A., Genis A, Camarena Medellín B., Fresan A, Apiquian R., Escamilla M, Nicolini H. Association study and meta-analysis of apolipoprotein E gene and Mexican patients with schizophrenia. XV World congress of psychiatric genetics XV, New York, NY, USA. 7-11 October, 2007.

Tovilla-Zarate C.A., Genis A, Camarena Medellín B., Fresan A, Apiquian R., Escamilla M, Nicolini H. Association of APOE genotypes in a sample of latino schizophrenia sib pairs. XIV World congress of psychiatric genetics XV, Sardinia, Italy, 31-03 November of 2006.

13 ANEXO 3: PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES

Tovilla-Zarate C., Camarena Medellín B., Fresan Ana, López Lilia, Nicolini Humberto.
Pérdida de la Asociación del polimorfismo Val158/Met del gen COMT y la severidad clínica de la esquizofrenia. XXXIII congreso nacional de genética humana, 19-22 de noviembre de 2008, Asociación Mexicana de genética humana, A.C., Puerto Vallarta, Jalisco. México.

Tovilla-Zarate C., Camarena Medellín B., Fresan Ana, López Lilia, Nicolini Humberto.
Estudio genético entre el polimorfismo Val158Met de la COMT en pacientes con esquizofrenia. XXII Reunión anual de investigación, 3-5 de septiembre de 2008, Instituto Nacional de Psiquiatría., México D. F., México.

Tovilla-Zarate C., Camarena Medellín B., Fresan Ana, López Lilia, Nicolini Humberto.
Estudio genético entre el polimorfismo Val158Met de la COMT en pacientes con esquizofrenia. XXXII congreso nacional de genética humana, 7-11 de noviembre de 2007, Asociación Mexicana de genética humana, A.C., Oaxaca, Oax. México

Tovilla-Zarate C., Camarena Medellín B., Fresan Ana, López Lilia, Nicolini Humberto.
Efecto protector del alelo $\epsilon 2$ de ApoE al desarrollo de esquizofrenia en una muestra de pares de hermanos afectados. II congreso nacional de medicina genómica, octubre de 2006, Asociación mexicana de medicina genómica, INMEGEN, México, D. F. México.

Tovilla-Zarate C., Camarena Medellín B., Fresan Ana, López Lilia, Nicolini Humberto.
Estudio de asociación del gen de la ApoE en pares de hermanos con esquizofrenia. XXI Reunión anual de investigación, 1-3 de septiembre de 2006, Instituto Nacional de Psiquiatría., México D. F., México

Tovilla-Zarate C., Camarena Medellín B., Fresan Ana, López Lilia, Nicolini Humberto.
Pérdida de asociación del alelo $\epsilon 4$ de ApoE y esquizofrenia en una muestra de pares de hermanos afectados. XXXI congreso nacional de genética humana, 7-11 de noviembre de 2006, Asociación Mexicana de genética humana, A.C., Chihuahua, Chi., México.

14 ANEXO 4: COLABORACIONES

PRESENTACIONES INTERNACIONALES

Camarena B, Aguilar A, Tovilla A, Apiquian R, Fresan A, Medina R, Raventos H, Canive J, Munoz R, Mendoza R, Jerez A, Ontiveros A, Escamilla M, Nicolini H. Analysis of MAO-A and MAO-B genes in Mexican schizophrenic patients. XV World Congress on Psychiatric Genetics, New York, NY, USA. 7-11 October, 2007

Genis A, Camarena B, Aguilar A, Tovilla A, Apiquian R, Fresan A, Medina R, Raventos H, Canive J, Munoz R, Mendoza R, Jerez A, Ontiveros A, Escamilla M, Nicolini H. Genetic evidence for DRD4 gene of Mexican schizophrenia patients. XV World Congress on Psychiatric Genetics, New York, NY, USA. 7-11 October, 2007

PRESENTACIONES NACIONALES

Caballero Santana, S., Tovilla-Zarate C., Martínez-Mota L. Efecto protector de los estrógenos en la enfermedad de Alzheimer. V encuentro participación de la mujer en la ciencia, 31-23 de mayo de 2008, León, Guanajuato, México.

Genis A, Tovilla-Zarate C., Aguilar A, Camarena Medellín B., Nicolini H., Estudio genético de DRD4 en pacientes esquizofrénicos mexicanos. XXII Reunión anual de investigación, 3-5 de septiembre de 2008, Instituto Nacional de Psiquiatría., México D. F, México

Genis A, Tovilla-Zarate C., Aguilar A, Camarena Medellín B., Nicolini H. Evidencia genética del DRD4 en pacientes esquizofrénicos mexicanos. XXXII congreso nacional de genética humana, 7-11 de noviembre de 2007, Asociación Mexicana de genética humana, A.C., Oaxaca, Oax. México.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 24 de Junio de 2009, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Doctor en Ciencias Genómicas, al M. en C. Carlos Alfonso Tovilla Zarate

Dr. Humberto Nicolini

Dr. Juan C. Díaz

Dra. Lorena Orozco

Dra. Martha Yocupicio

Dra. Ana Fresan

Dr. Mauricio Castañon

Dra. Sara Frías
