



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA FUENTE MUÑÍZ"

**"ESTUDIO DE ASOCIACION ENTRE EL GEN RORB Y EL
TRASTORNO BIPOLAR EN ADULTOS"**

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALIZACIÓN EN PSIQUIATRÍA

DR. RODRIGO HERVERT RIVERA

Asesores:

Tutor teórico: **DR. CARLOS BERLANGA CISNEROS**

Tutor metodológico: **DRA. ADRIANA DÍAZ ANZALDÚA**

México, D. F. 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que contribuyeron a la realización de este trabajo y en general de todo mi desarrollo profesional y personal.

Gracias a mis padres por todo su apoyo, cariño y comprensión. Gracias al resto de mi familia y amigos que han estado a mi lado en los buenos momentos y en las situaciones difíciles que se me han presentado a lo largo de la vida.

Gracias a mis tutores la Dra. Adriana Díaz y al Dr. Carlos Berlanga por su apoyo y su guía durante la realización de este trabajo. Y por último pero no menos importante gracias a mis maestros de la carrera y del Instituto de quienes he aprendido todo sobre la profesión.

INDICE

	Pág.
1.- Introducción.....	4
1.1.- Impacto y características del trastorno bipolar.....	4
1.2.- Importancia de la investigación sobre el trastorno bipolar.....	8
1.3.- La Genética y el TBP.....	9
1.4.- El TBP y los genes del ciclo circadiano.....	12
2.- Planteamiento del problema.....	14
3.- Justificación.....	16
4.- Hipótesis según el tipo de estudio.....	18
5.- Objetivos de la investigación.....	18
6.- Material y método.....	18
6.1.- Población en estudio y tamaño de la muestra.....	19
6.2.- Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	19
6.3.- Variables.....	21
7.- Procedimiento y análisis de resultados.....	23
8.- Consideraciones éticas.....	28
9.- Resultados.....	29
10.- Discusión.....	33
11.- Conclusiones.....	35
12.- Cronograma.....	36
13.- Bibliografía.....	36

INTRODUCCIÓN

Impacto y características del Trastorno Bipolar

Los trastornos psiquiátricos y entre ellos los de tipo afectivo constituyen un grupo de desórdenes con muy alta prevalencia en la población general a nivel mundial, y México no es una excepción. Las perspectivas epidemiológicas que fueron estimadas para el año 2010 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) las sitúa en la segunda posición dentro de las causas de morbimortalidad, lo que significa una epidemia en términos de salud pública.

El trastorno bipolar (TBP) se ubica dentro del grupo de los trastornos afectivos según la clasificación del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV). Es uno de los problemas de salud más importantes en todas las sociedades y se relaciona con gran morbilidad y mortalidad.

El TBP es una enfermedad severa e incapacitante. Los pacientes bipolares muestran dificultades serias en parámetros sociales, en áreas de trabajo y descanso y sentimientos de baja autoestima aún después de remisión de fases. La disrupción social se relaciona con la duración de la enfermedad y las hospitalizaciones frecuentes. La evolución del TBP se acompaña de altas tasa de desempleo, educación inconclusa, problemas de vivienda y otras dificultades.

Los estresores psicosociales son factores que predisponen a los pacientes para presentar recaídas de la enfermedad y por lo tanto un contexto social desfavorable justifica la incorporación de estos pacientes en programas de rehabilitación estructurados e intensivos para mejorar su calidad de vida. La remisión completa sin recaídas en un año está relacionada al reporte de mayor apoyo social. A pesar de que la farmacoterapia es la base fundamental del tratamiento del TBP, las intervenciones psicosociales estructuradas han mostrado ser un medio efectivo de contribuir a mantener la adherencia al tratamiento y para la prevención de recaídas. ⁽¹⁾

La prevalencia del TBP en la población general asciende a 1-3%, aunque hay estudios que la ubican alrededor de un 5%. Esta frecuencia es similar en varones y mujeres. (2)

De las investigaciones realizadas a partir de la década de 1990 surge que los trastornos del espectro bipolar alcanzan el 30-55% de los trastornos depresivos mayores. Los ciclos rápidos son más frecuentes en el denominado TBP II. Entre pacientes con fobia social se encontró una prevalencia del TBP II del 9.1% y un 46.4 % de depresión unipolar. Cuando se presenta la comorbilidad entre fobia social y TBP, los síntomas tienden a ser más graves, con múltiples comorbilidades y abuso de alcohol.

Al evaluar a personas con TBP y alcoholismo se determinó que el 38.4% de los pacientes realiza por lo menos un intento de suicidio contra un 21.7% de aquellos que no consumen alcohol. Los familiares de primer grado de un alcohólico suicida que presentan TBP tienen una posibilidad de 40.7% de intentos de suicidio, mientras que en las otras familias esa posibilidad disminuye al 19%. Esto demuestra que la comorbilidad con alcoholismo se asocia a alto grado de intentos de suicidio entre familiares con TBP. (2)

En México alrededor del 1.6% de la población padece TBP. Hay menos información disponible sobre este trastorno en los niños y adolescentes. Datos recientes indican que el TBP pediátrico es un problema creciente de salud cuya incidencia ha aumentado 40 veces en la última década y que ahora representa 20% de todos los menores que ingresan en hospitales psiquiátricos. Se desconoce si este aumento representa una mayor conciencia del trastorno o que el diagnóstico se comienza a aplicar ampliamente.

El TBP se caracteriza por períodos de humor anormalmente elevado (manía), casi siempre con episodios depresivos intercalados. La variación del humor entre esos extremos con frecuencia causa un impacto negativo tanto en el paciente como en la vida familiar, finanzas, relaciones sociales y de amistad, trabajo y calidad de vida.

El término 'manía' tiene su origen en los escritos de Hipócrates. Sin embargo, en contraste con su uso actual, esta palabra no se relacionaba con el estado de ánimo sino que se empleaba para describir a pacientes con estados delirantes psicóticos que, a diferencia de lo que sucede en el denominado 'delirio', no cursaban con fiebre. Posiblemente ese concepto englobaba muchos cuadros de lo que hoy clasificamos como esquizofrenia. ⁽¹⁾

Areteo de Capadocia (s. II d.C.) describió casos de agitación maníaca e inhibición alternantes en una misma persona. Él atribuía esta condición a desequilibrios humorales. Su observación influyó decisivamente en Emil Kraepelin, quien acuñó el concepto de 'locura maníaco-depresiva'. En 1957, el también psiquiatra alemán Karl Leonhard propuso separar los trastornos afectivos en 'bipolar' y 'unipolar', éste último relacionado con personas que tenían historia sólo de depresión o sólo de manía. Esa corriente se ha impuesto finalmente en las clasificaciones actuales de los trastornos del afecto, de forma que el término 'bipolar' hace alusión a todos los casos en los que se curse o se haya cursado con un síndrome de manía o hipomanía. ⁽¹⁾

Desde la década de 1960 en EE.UU. se ha utilizado la distinción entre Bipolar I y Bipolar II. En el primer caso ha existido algún episodio de manía, mientras que en los segundos habrían existido episodios de hipomanía. ⁽³⁾ El TBP II puede ser una forma más leve del TBP I con respecto a los síntomas y episodios maniacos, pero podría ser un fenotipo más maligno con respecto a la carga de la enfermedad. En contraste con los individuos con TBP I, las personas con TBP II pueden experimentar mayor cronicidad y un curso de la enfermedad que sigue un distinto patrón estacional, una menor probabilidad de volver a un nivel funcional premórbido entre los episodios, mayores tasas de ciclado rápido, periodos más cortos de eutimia y un deterioro mayor por los síntomas depresivos y síntomas depresivos sub-clínicos ⁽⁴⁾.

El DSM-IV describe tres tipos de episodios afectivos (el depresivo mayor, el maníaco y el hipomaníaco).

La combinación de uno u otro modo de estos episodios, o cumplir totalmente o no los criterios diagnósticos de los mismos es lo que integra la definición de los diversos tipos de trastornos específicos del estado de afecto. De esta manera, la presencia de un antecedente de algún episodio de manía o hipomanía define a los trastornos bipolares, mientras que la ausencia de un episodio maniaco o hipomaniaco previo en presencia de la depresión ayuda a definir los trastornos afectivos llamados unipolares.

Hasta el momento actual no hay ninguna prueba de laboratorio para el TBP o cualquier otro trastorno psiquiátrico, ya sea en los niños o adultos. En su lugar, el diagnóstico del TBP se basa enteramente en la historia clínica detallada. ⁽⁵⁾

La edad de inicio del TBP puede variar, pero lo más frecuente es que sea entre los 20 y 25 años de edad. Es más difícil especificar el comienzo de este trastorno en niños y adolescentes, ya que los síntomas maniacos pueden manifestarse de forma atípica.

En el TBP hay mayor recurrencia que en los trastornos unipolares. Más del 90% de las personas que presentan un episodio de manía presentará episodios futuros. Es común que los episodios maniacos tengan un inicio abrupto, presentando la sintomatología en algunos días o semanas. La duración de dichos episodios, por su parte, puede ser distinta de un paciente a otro, desde días hasta meses. Tanto el inicio como la duración de los episodios pueden variar incluso en el mismo paciente. Anteriormente, cuando no se contaba con medicamentos efectivos contra este padecimiento, la duración media era de seis meses a un año. A partir de la mejoría farmacológica los episodios pueden durar de semanas a meses. A pesar de los nuevos medicamentos, los episodios depresivos siguen teniendo una duración mayor que la manía. El número de episodios tanto maniacos como depresivos tiende a ser mayor en pacientes con trastorno bipolar tipo I. En algunos estudios previos al inicio del tratamiento con litio se sugiere que se presentan aproximadamente cuatro episodios por cada diez años.

El intervalo entre los episodios tiende a disminuir a medida que aumenta la edad (con la edad los intervalos asintomáticos entre episodios son cada vez más cortos). ⁽⁵⁾

La velocidad de recuperación será más rápida cuando el episodio a tratar es el maniaco, con una mediana de recuperación de cinco semanas. En los episodios depresivos la mediana será de nueve semanas y de 14 semanas en los episodios mixtos. Hay controversia en los datos relacionado con la recurrencia, esto debido en gran parte a las diferentes definiciones de recaída. Aun así, la tasa media de recaída se sitúa entre un 60 y un 90% y se requieren más estudios de tipo longitudinal para determinar estos valores de forma precisa. Está comprobado que el riesgo de recaídas aumentará tanto con la edad del paciente como cuanto más larga sea la historia previa de episodios y mayor el número de episodios pasados.

La mayoría de los sujetos con TBP I vuelven a la eutimia entre los episodios, pero algunos (20-30%) siguen mostrando fluctuaciones en el estado del ánimo, labilidad afectiva y alteraciones en la funcionalidad social y laboral principalmente. Aproximadamente del 5 al 15% de los individuos con TBP I llegan a presentar múltiples (cuatro o más) episodios afectivos en el periodo de un año, incluyendo depresivos, maniacos, hipomaniacos y/o mixtos. Este patrón se denomina de ciclos rápidos y se asocia a un mal pronóstico. ⁽⁶⁾

Es importante mencionar que estos datos no incluyen casos de trastorno bipolar tipo II ni casos de ciclotimia, padecimientos sobre los que no se han efectuado estudios epidemiológicos a gran escala. ⁽⁶⁾

Importancia de la investigación sobre el trastorno bipolar

En las últimas décadas se han llevado a cabo investigaciones notables sobre el TBP en áreas como la epidemiología, la psicopatología, la farmacología y la genética, lo cual ha generado mayor reconocimiento de esta enfermedad.

Pese a los avances en el tratamiento del TBP, una proporción significativa de los pacientes experimenta síntomas discapacitantes entre los episodios y las tasas de recaída son muy altas.

Estas circunstancias sugieren que hay una necesidad imprescindible para conseguir una mejor comprensión de los factores desencadenantes de la recaída y dirigirse a ellos con objetivos específicos. Entre los más destacados correlatos de los episodios afectivos y de una inadecuada recuperación se encuentran los trastornos del sueño. Sin embargo, éstos han sido relativamente poco estudiados como para intentar comprender el mecanismo y el tratamiento en el TBP. Los síntomas en el sueño pueden estar presentes para cualquiera de los tipos de TBP.

(7)

La Genética y el TBP

Se demostró que el TBP tiende a concentrarse especialmente en ciertas familias. Los hallazgos de estudios realizados en pares de gemelos, tanto monocigóticos como dicigóticos y las investigaciones en familias en las que se había adoptado a personas que posteriormente presentaron TBP contribuyeron a establecer de manera contundente que este trastorno tiene una base genética, además de cierta influencia de factores de otro tipo. Se estima que la heredabilidad del TBP es de 60 a 80%. Ésta se refiere a la varianza en la enfermedad debida a causas genéticas en una población dada.

A pesar de que se ha demostrado que el TBP es altamente heredable, se desconoce mucho sobre los genes que incrementan la susceptibilidad a este trastorno. (8)

Como es el caso de otras condiciones psiquiátricas, el TBP se considera etiológicamente complejo.

Las enfermedades con esta característica siguen un modelo de herencia no mendeliano o de tipo poligénico multifactorial, las cuales están condicionadas por la interacción no lineal de diferentes rasgos entre sí, que resultan de la acción combinada de varios genes y de factores epigenéticos implicados en la vulnerabilidad o protección a la enfermedad, las características clínicas, la edad de inicio y la respuesta terapéutica entre otros aspectos. Para su investigación ofrecen retos mayores tales como la definición del fenotipo, la determinación del estado de afección, la existencia de fenocopias, es decir de cuadros clínicos similares no asociados a susceptibilidad genética, y la heterogeneidad genética cuando diferentes mutaciones o polimorfismos se relacionan con fenotipos similares.⁽⁹⁾ De esta forma, mutaciones o polimorfismos en uno o más genes independientes pueden producir similares manifestaciones fenotípicas y diferentes variantes en el mismo gen puede causar distintos síntomas relacionados.

Debido a la complejidad del TBP, en lugar de realizar únicamente estudios de ligamiento en familias multi-generacionales o buscar un solo gen de efecto mayor, en la actualidad se realizan también diversos estudios epidemiológicos que tratan de identificar marcadores genéticos de vulnerabilidad para los trastornos bipolares o para endofenotipos relacionados.⁽¹⁰⁾

Ante la incertidumbre en la estimación de los parámetros de un modelo genético para rasgos complejos, el uso de la metodología de ligamiento genético basado en *LOD Scores* (puntuación obtenida del logaritmo del *odds*) en familias extensas ha sido poco efectivo para identificar genes involucrados en el TBP. El *LOD score* es un término estadístico que indica qué tan ligado o no está un rasgo, en este caso el fenotipo bipolar, a un determinados locus genético.

Por otro lado, los estudios de casos y controles han permitido identificar variantes genéticas asociadas con trastornos neuro-psiquiátricos, pero tienen la gran desventaja de ser susceptibles a la estructura poblacional, es decir, que pueden obtenerse resultados falsos positivos debido a diferencias étnicas imperceptibles entre el grupo de casos y el de controles.

Otra estrategia permite realizar estudios de casos y controles sin el problema de la estructura poblacional. Ésta comúnmente se conoce como estudios familiares de asociación. ⁽¹¹⁾

Como se mencionó antes, en el TBP probablemente se hallan implicados múltiples genes, algunos de ellos relacionados con el funcionamiento cerebral. Cada uno de ellos podría tener un efecto menor, con escaso valor individual, que difícilmente se podría identificar en estudios de ligamiento. Sin embargo, estudios de asociación basada en familias, como la presente investigación, pueden tener mayor relevancia poblacional y contar con un control étnico perfecto, ya que se comparan las variantes genéticas transmitidas a los pacientes con TBP con las variantes no transmitidas de sus padres. ⁽¹⁰⁾

Entre los loci genéticos que se han encontrado ligados o asociados a la transmisión del TBP encontramos varias regiones cromosómicas, lo que apoya la idea de una herencia poligénica, heterogénea y con penetrancia incompleta, sometida a influencia de efectos ambientales. En pocos casos se han reportado evidencias de transmisión autosómica dominante en familias aisladas, esto reportado por ejemplo por Spence y colaboradores en 1995 y por Rice y colaboradores en 1987. ⁽¹⁰⁾

En el 2001, Maziade y colaboradores encontraron relacionada a la transmisión del TBP el área cercana al marcador D18S1145 en el cromosoma 18q12 y al D6S334 en 6p 22-24. Otras áreas con altas probabilidades son 3q; 4p; 4q; 10p; 12q; 16p; 18q; 21q y Xq. También en 2001, McInnes y colaboradores encontraron seis genes posiblemente implicados en la transmisión del TBP en la región 18p11.3. Ese mismo año, McMahon y colaboradores demostraron una relación entre 18q y el TBP II en pares de hermanos. Otros importantes estudios como el de Saleem y colaboradores en 2001 y Kelsoe y colaboradores en el 2000 demuestran un posible locus de susceptibilidad en el cromosoma 22, en el que se da una alta frecuencia de repetición de CAG en poca familias con miembros que presentan esquizofrenia y trastorno bipolar. ⁽¹¹⁾

Se ha demostrado que varios genes involucrados en la generación y regulación de los ritmos circadianos y en el sistema de sueño se asocian con el TBP, entre los que se incluyen los genes *Timeless*, *Clock* y *BMal1*. Estas asociaciones son relativamente débiles, lo cual es consistente con la propuesta de que el TBP está probablemente asociado con múltiples genes con efectos pequeños. ⁽¹¹⁾

El TBP y los genes del ciclo circadiano

Se ha propuesto que los pacientes con TBP tienen cambios anormales o sistemas circadianos arrítmicos. Entre estos cambios se encuentra la disminución de la necesidad de dormir y la presencia de ciclos rápidos.⁽¹³⁻¹⁵⁾ Dormir menos incluso ha sido señalado como uno de los primeros síntomas para diferenciar a los niños con TBP de las personas con Trastorno de hiperactividad y déficit de atención (TDAH) ⁽¹⁶⁾. Por estas razones, anomalías en general del ritmo circadiano y del reloj circadiano de los genes, en particular, se han propuesto como posibles fundamentos mecánicos para el TBP, sobre todo para los fenómenos de la bicicleta y el cambio ⁽¹⁷⁻²⁶⁾.

El término circadiano se refiere a un plazo de “alrededor de un día”. El ciclo circadiano es un sistema simple pero muy intrincado. El "reloj maestro" se encuentra en el núcleo supraquiasmático (SCN) en el hipotálamo anterior. ⁽¹¹⁾

El SCN regula los ritmos circadianos y se complementa por un gran número de relojes periféricos a través de los órganos y las células. Cuando el sistema está en armonía, es totalmente sincronizado por el SCN. Pero ésta puede perderse fácilmente en momentos diferentes, incluso entre el SCN y el tiempo exterior y entre el SNC y los diferentes órganos del cuerpo. ⁽⁸⁾ El SCN es muy sensible a la luz, el reloj en el hígado es muy sensible a alimentos y los relojes en los músculos son sensibles al ejercicio. Así, hay muchas entradas que pueden influir y contribuir a la armonía y a alterar la regulación.

Entre los genes estudiados se encuentran los de Clock, algunos de los cuales ya fueron mencionados. También se han descrito asociaciones entre el trastorno afectivo estacional (SAD), una variante del TBP, y polimorfismos en genes del reloj *PER2*, *ARNTL/BMAL1* y *NPAS* ^(27,29). Un gen que recientemente se propuso en el estudio del TBP es ROR-beta (RORB), que es un factor de transcripción relacionado con el ciclo circadiano y pertenece a la familia de receptores nucleares. ⁽⁹⁾

Los miembros de esta superfamilia de receptores hormonales esteroides comparten una estructura común modular compuesta por un dominio de trans-activación, un dominio de unión al ADN y un dominio de unión al ligando. Por lo general, su función de trans-activación de la transcripción está regulada por pequeñas moléculas lipofílicas, tales como las hormonas esteroides, vitamina D, ácido retinoico y la hormona tiroidea. Desempeñan una función reguladora en la neurogénesis, el metabolismo óseo y en los ritmos circadianos. Estas moléculas son sintetizadas en el organismo y pasan fácilmente a través de la membrana plasmática para llegar a los receptores correspondientes dentro de la célula.

RORB es uno de los receptores nucleares huérfanos, que forman una subfamilia con ROR-alfa y ROR-gamma. En 1994, a través de ensayos de unión *in vitro*, Carlberg y colaboradores demostraron que RORB pueden unirse, ya sea como un monómero o como un homodímero, al elemento de respuesta del ácido retinoico. En ambos sitios de unión monomérica u homodimérica, RORB muestra actividad trans-activacional. Se encontró que RORB y RORA interactúan con NM23-2, una nucleósido-difosfato quinasa involucrada en la organogénesis y la diferenciación. ⁽¹³⁾ Por otra parte, en estudios con modelos animales de depresión se identificó que la expresión de RORA y RORB se encontraba incrementada en la amígdala y disminuida en la corteza prefrontal.

El gen *RORB* se expresa de forma más limitada que *RORA* y la expresión más alta se presenta en el ojo, la glándula pineal y el cerebro, sobre todo en la corteza sensorial primaria (nivel IV de la somatosensorial corteza) y el núcleo supraquiasmático del hipotálamo ⁽³²⁻³⁴⁾. Al igual que *RORA*, la expresión de *RORB* cambia en función del ritmo circadiano en algunos tejidos, y ratones que carecen de la expresión de *RORB* (conocidos como knockout *RORB* - / -) presentan alteraciones del ritmo circadiano. ^(5,10)

En relación con estudios de asociación en humanos, en 2009 se llevó a cabo una investigación de la Universidad de Indiana en la que se analizó la evidencia de asociación genética entre *RORB* y TBP infantil y se reportó que cuatro polimorfismos (SNPs) en este gen mostraron asociaciones positivas con el fenotipo bipolar pediátrico que sobrevivieron a la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Tres bloques de haplotipos en *RORB* que implican otros 11 SNPs también se asociaron con la enfermedad. Sin embargo, estas asociaciones significativas no se repitieron en la muestra de tríos. No hubo evidencia de asociación entre el TBP pediátrico y cualquier SNP de *RORA* o bloques de haplotipos después de la prueba de corrección múltiple. Además, no se encontró una fuerte evidencia de asociación entre la edad al inicio del TBP con cualquier polimorfismo de *RORA* o *RORB* ⁽³⁵⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El TBP es una enfermedad compleja en la cual, a pesar de haberse comprobado la participación decisiva de la genética, no se ha confirmado la participación de ningún gen con efecto mayor, a excepción de ciertas mutaciones que se han identificado en familias aisladas, como es el caso de los estudios del gen *DISC1*. Dadas las características de un trastorno complejo, el mapeo de loci (varios sitios específicos dentro del genoma) involucrados en TBP puede ser complicado. ⁽⁹⁾

A partir de los resultados de diversas investigaciones se ha confirmado que los familiares en primer grado de pacientes con TBP presentan trastornos del estado de ánimo con mayor frecuencia que la población general. Sin embargo, en la mayoría de los casos no se conoce el modo de transmisión del TBP, a pesar de que en pocas familias aisladas se ha sugerido una herencia autosómico dominante.

Aunque los estudios de familias, gemelos y de adopción han proporcionado fuerte evidencia de que la variación genética tiene una función importante en la etiología del TBP, ha sido difícil identificar de manera definitiva genes específicos involucrados. Los estudios de herencia han sugerido que múltiples genes pueden intervenir en la etiología del trastorno. La elección de las características estudiadas en la genética del TBP se ha guiado en gran medida por la experiencia clínica. Ciertas características muestran que la agregación familiar puede ser particularmente prometedora, y la mayoría de los rasgos que aumentan las señales de vinculación o asociación son de hecho familiares. Sin embargo, sólo una minoría de la multitud de características clínicas del TBP se ha estudiado.

De manera particular, en estudios de población infantil con TBP se ha encontrado asociación de variaciones en el gen que codifica para RORB, sin embargo no hay datos que nos indiquen que esta asociación se haya detectado en población adulta. Además, no se encontraron reportes sobre este gen y el TBP en población mexicana.

La presencia o ausencia de asociación o ligamiento entre un gen y un fenotipo específico (en este caso el TBP) depende en muchos casos de la población analizada, de manera que es necesario investigar la transmisión de variantes genéticas de RORB en nuestro grupo poblacional. Además, muchos de los estudios a nivel de genética molecular en el TBP son del tipo clásico de casos y controles, en los que diferencias étnicas entre ambos grupos puede resultar en falsos positivos.

Una buena alternativa a este tipo de análisis es aquel en el que se analicen las variantes genéticas que los padres transmitieron a los pacientes con TBP (alelos caso) contra los alelos que estos mismos padres no transmitieron a sus hijos con el trastorno (alelos control). En este método hay un control étnico perfecto entre los “casos” y los “controles”, lo cual impide que haya posibles asociaciones afectadas no tanto por la presencia o ausencia de TBP sino por diferencias en cuanto a origen étnico.

JUSTIFICACIÓN

Uno de los mayores compromisos para la Ciencia en este nuevo siglo es el estudio de los rasgos genéticamente complejos involucrados en las enfermedades humanas más comunes y de mayor impacto epidemiológico. Los descubrimientos en este campo muy seguramente producirán cambios significativos en los paradigmas actuales de la Medicina y las neurociencias básicas, en cuanto a la filosofía y conceptualización de salud y enfermedad, de la nosología, la clínica y el manejo de las afecciones más comunes de la humanidad.

El TBP se encuentra posicionado en el sexto puesto entre las diez principales causas de discapacidad en el mundo en los individuos con edades comprendidas entre los 15 y los 44 años. El TBP, por su sintomatología y tendencia a la cronicidad produce un fuerte impacto económico, el cual resulta principalmente de la erogación por prestaciones tanto en el ámbito hospitalario como en la atención ambulatoria y de la pérdida de productividad de los pacientes y de sus familiares.

La prevalencia del TBP I es de un 0.8% (0.4 a 1.6%) y la del TBP II de por lo menos 0.5% en la población adulta. La frecuencia es similar en hombres y mujeres. Como se mencionó con anterioridad, la edad de comienzo se sitúa en torno a los 21 años como media, considerando que el estrato de edad más frecuente es el de los 14 a 19 años, seguido del de los 20 a 24 años. Por tanto, el primer episodio ocurre en una edad relativamente joven.

Se ha encontrado relación entre la manera en que se regula y altera el ciclo circadiano y el TBP. Esta relación puede estar mediada en parte por la presencia de variantes genéticas de los genes Clock. Además, ciertas variantes de este tipo se han asociado con el TBP en otras poblaciones. De esta manera, los genes relacionados con el ciclo circadiano parecen ser buenos candidatos en la búsqueda de factores que incrementen la susceptibilidad al TBP. ⁽³⁶⁾

Se cuenta con una muestra significativa de pacientes con TBP I y II provenientes de la Clínica de Trastornos Afectivos del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” (INPRF) y familiares de primer grado. La parte experimental se llevó a cabo en la Subdirección de Investigaciones Clínicas del mismo instituto, en el Departamento de Genética Psiquiátrica, el cual cuenta con el equipo y los reactivos necesarios para llevar a cabo aislamiento, purificación y cuantificación del ADN genómico, así como equipo y los reactivos químicos para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, que se puede emplear para obtener los genotipos de la región de interés en el gen RORB. Antes del inicio del presente trabajo de tesis, se contó con la experiencia para aplicar entrevistas diagnósticas estandarizadas (SCID-I) y con un equipo multidisciplinario para aplicar cuestionarios y escalas, así como para obtener una muestra de sangre periférica por punción venosa.

Esta investigación permitirá continuar con un proyecto que está encaminado a la caracterización fenotípica de pacientes con TBP y de sus familiares de primer, segundo y en algunos casos tercer grado, con la finalidad de obtener un banco de ADN que permita realizar análisis como genotipificación. El presente estudio ayudará a establecer la relación del gen RORB con el TBP, con lo cual se tendrá una mayor información para una posible identificación más temprana del trastorno. Esto podría a largo plazo contribuir incluso a mejorar la atención de los pacientes que padezcan esta patología y a mejorar su calidad de vida.

HIPÓTESIS SEGÚN EL TIPO DE ESTUDIO

H0: El polimorfismo rs1157358 del gen RORB se asocia con la susceptibilidad al TBP I y II en nuestra muestra de la población mexicana.

H1: El polimorfismo rs1157358 del gen RORB no se asocia con la susceptibilidad al TBP I y II en nuestra muestra de la población mexicana.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN (GENERAL Y ESPECÍFICOS)

Objetivo General: Determinar si existe asociación entre el polimorfismo rs1157358 del gen RORB y el TBP I y II en pacientes adultos y familiares de primer grado del INPRF.

Objetivos Específicos:

- 1) Conocer y aplicar técnicas de biología molecular, incluyendo PCR en Tiempo Real para identificar variantes genéticas en la muestra estudiada.
- 2) Determinar por medio de PCR en Tiempo Real los alelos que portan los pacientes y sus familiares (polimorfismo rs1157358).
- 3) Determinar si hay correlación entre genotipos y/o alelos y características clínicas.

MATERIAL Y MÉTODO

Tipo de estudio

Finalidad:

–*Descriptiva*

Secuencia temporal:

–*Transversal*

Control de asignación a los factores de estudio:

–*Observacional*

El estudio es de asociación basada en familias. En él se empleó una modificación del estudio típico de casos y controles, ya que los ‘casos’ son las variantes genéticas presentes en los pacientes (que fueron transmitidas por sus padres) y los ‘controles’ son aquellas variantes que los padres no transmitieron al hijo con TBP. Un estudio típico de casos y controles tiene la inconveniencia de estar sujeto a posibles resultados falsos positivos en el campo de la genética debido a la estratificación poblacional, es decir, a posibles diferencias étnicas entre ambos grupos. En esta investigación los alelos (variantes genéticas) transmitidos y no transmitidos pertenecen necesariamente al mismo grupo étnico, por lo que desaparece el problema de estratificación poblacional.

Población en estudio y tamaño de la muestra

La muestra es de 269 personas y fue obtenida como parte del proyecto titulado “estudio de asociación entre el trastorno bipolar y variantes genéticas candidatas: en busca de endofenotipos” realizado por la Subdirección de Investigaciones Clínicas con el financiamiento económico de CONACYT, proyecto 91279 y del INPRF, proyecto 2070. La muestra está compuesta por 115 pacientes con trastorno bipolar I ó II, quienes tienen genealogía mexicana y 154 familiares de primer grado.

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterio de Inclusión para pacientes de la muestra obtenida como parte del proyecto titulado “estudio de asociación entre el trastorno bipolar y variantes genéticas candidatas; busca de endofenotipos”:

- Que fueran pacientes con diagnóstico de TBP-I ó II basado en el DSM-IV (SCID-I).
- Que aceptaran participar en el estudio previa firma de carta de consentimiento informado.
- Que estuvieran clínicamente controlados (eutimia).

- Que obtuvieran un valor menor de 10 puntos en escala de Young para manía y menor de 8 puntos en escala de depresión de Hamilton.
- Que tuvieran genealogía mexicana (3-4 abuelos nacidos en México).

Criterios de inclusión para familiares de la muestra obtenida como parte del proyecto titulado “estudio de asociación entre el trastorno bipolar y variantes genéticas candidatas; busca de endofenotipos”

- Que tuvieran consanguinidad con un paciente con TBP tipo I ó II.
- Que hubieran aceptado participar en el estudio previa firma de carta de consentimiento informado.
- Que fueran mayores de edad o en caso de ser menor de edad que contaran con consentimiento propio y de alguno de los padres o tutores.

Criterios de Exclusión para pacientes de la muestra obtenida como parte del proyecto titulado “estudio de asociación entre el trastorno bipolar y variantes genéticas candidatas; busca de endofenotipos”

- Que no cumplieran con los criterios completos para trastorno bipolar de acuerdo con SCID-I.
- Incapacidad para dar consentimiento informado por escrito.

Criterios de Exclusión para familiares de la muestra obtenida como parte del proyecto titulado “estudio de asociación entre el trastorno bipolar y variantes genéticas candidatas; busca de endofenotipos”

- Incapacidad para dar consentimiento informado por escrito.
- No ser familiares de primer grado de los pacientes incluidos en el estudio.

Criterios de Eliminación para pacientes y familiares de la muestra obtenida como parte del proyecto titulado “estudio de asociación entre el trastorno bipolar y variantes genéticas candidatas; busca de endofenotipos”

- Poca cantidad o mala calidad de ADN a partir de la muestra de sangre o saliva, que impida obtener el genotipo de RORB.
- Contar con un expediente incompleto.

Variables

Variable independiente: Alelos y Genotipos.

Definiciones

Alelo: Es una de las formas variantes de un gen en un locus (posición) o de un marcador particular en un cromosoma. Diferentes alelos de un gen producen variaciones en las características hereditarias tales como el color del cabello o el tipo de sangre. Cada una de las alternativas que puede tener un gen de un carácter.

Por regla general se conocen varias formas alélicas de cada gen; el alelo más extendido de una población se denomina "alelo normal o salvaje", mientras que los otros más escasos, se conocen como "alelos derivados".

Genotipo: El conjunto de genes característicos de cada especie, vegetal o animal, es decir, el genotipo son los genes en formato de ADN que un animal, un vegetal o un ser humano recibe de herencia de parte de sus dos progenitores, madre y padre, y que por tanto se encuentra conformado por las dos dotaciones de cromosomas que contienen la información genética del ser en cuestión.

Los genes encargados de la transmisión de los caracteres de la herencia siempre permanecen en el núcleo de la célula y será desde allí desde donde controlan la síntesis de las proteínas que se produce en el protoplasma. De manera específica, como en el caso de este estudio, el genotipo se refiere a los dos alelos (materno y paterno) que porta cada persona en una región del gen RORB.

Variable dependiente: Presencia o ausencia de TBP I ó II.

Antes del inicio de esta tesis, se había aplicado SCID-I a los pacientes para corroborar el diagnóstico de trastorno bipolar tipo I ó II y a los familiares para investigar la presencia de algún trastorno psiquiátrico.

SCID-I es una entrevista clínica semi-estructurada y está destinada a realizar los diagnósticos más importantes del eje I del DSM-IV.

Las entrevistas estructuradas se han desarrollado para aumentar la fiabilidad diagnóstica por medio de la estandarización del proceso de evaluación, para aumentar la validez diagnóstica, para facilitar la aplicación de los criterios diagnósticos del DSM-IV y para indagar sistemáticamente sobre síntomas que de otra forma podrían pasar desapercibidos.

Con la elaboración de la SCID se buscó obtener un instrumento eficiente y de fácil manejo, de tal forma que las ventajas de la entrevista estructurada pudieran ser aplicadas en el ámbito clínico.

SCID-I consta de tres elementos:

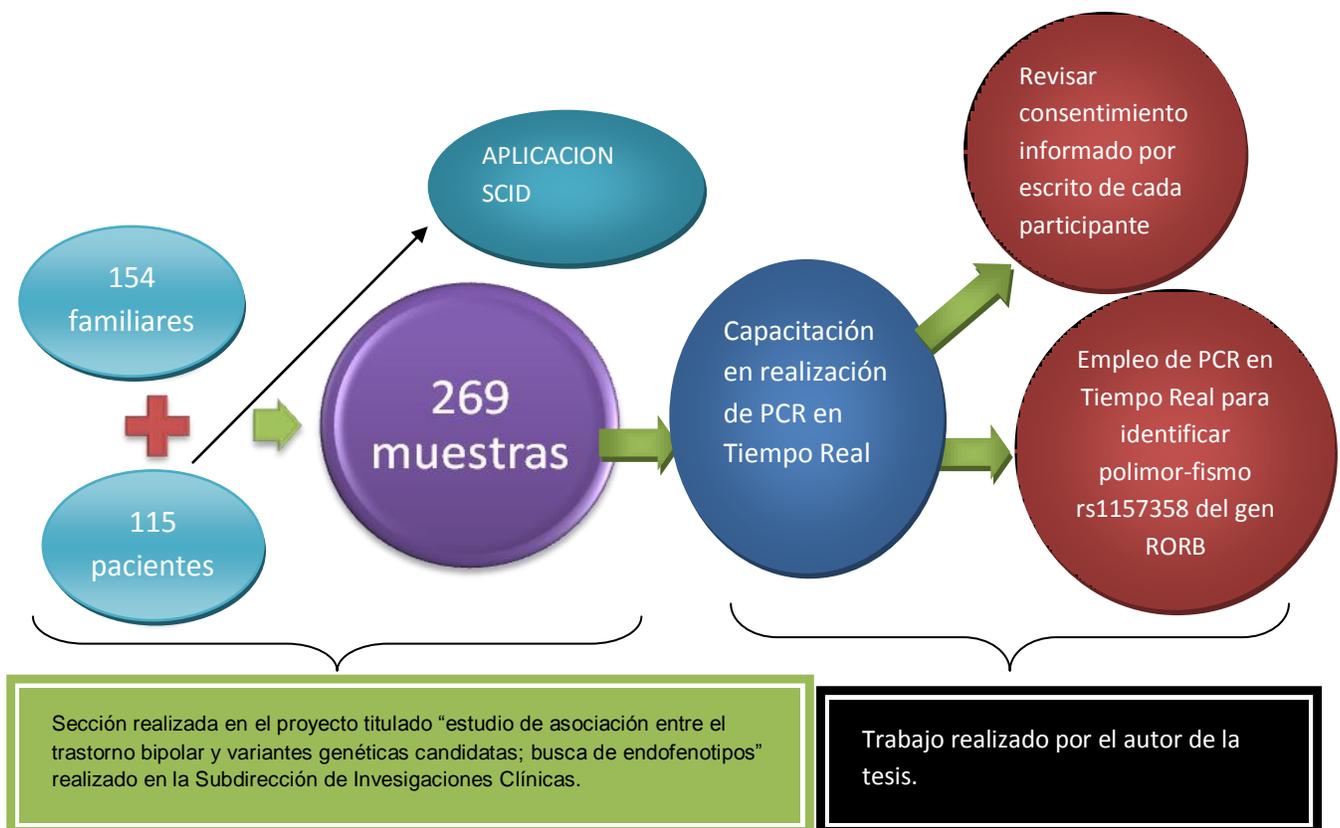
1. Guía del usuario. Trata las patologías más comunes. Proporciona las instrucciones necesarias para usar correctamente el SCID-I. Presenta diversas discusiones detalladas de cómo llegar al criterio diagnóstico DSM-IV.

También están incluidos un número de casos que ayudan al especialista en su aprendizaje del uso de SCID-I.

2. Cuaderno de puntuaciones. Contiene numerosas preguntas para la entrevista, así como los criterios diagnósticos del DSM-IV. Está especialmente diseñado para utilizarse con la hoja de resultados, con una duración de 45 a 90 minutos por sesión. Presentación tabulada, permitiendo al especialista pasar directamente de una sección a otra.

3. Cuaderno de aplicación. Contiene un resumen de los criterios diagnósticos. Se usa como archivo de las decisiones diagnósticas.

PROCEDIMIENTO Y ANALISIS DE RESULTADOS



PROCEDIMIENTO REALIZADO ANTES DEL INICIO DE LA TESIS

Se había aplicado SCID-I, Cuestionario para recabar datos demográficos, historia médica y árbol genealógico detallado, de tres a cuatro generaciones, Escala de Depresión de Hamilton y Escala de Manía de Young.

Se contaba con un banco de ADN que antes del inicio de este proyecto se había obtenido a partir de una muestra sanguínea de 5 a 10 ml por cada participante reclutado. En algunos casos, en lugar de sangre, se había obtenido una muestra de saliva. Para la extracción, aislamiento y purificación del ADN genómico a partir de leucocitos o células de descamación encontradas en la saliva se habían utilizado soluciones salinas, detergentes, así como proteasa para aislar el material genético que se encuentra en el núcleo. Se empleó una centrifuga Eppendorf 5810R, incubador (a 65°C) Amersham Life Science, baño húmedo Precisión y Vórtex Daigger Genie2. Las muestras de sangre fueron procesadas en una cámara de bioseguridad clase 2 Labcon. Se emplearon paquetes de extracción para sangre FlexiGene de Qiagen. Cuando se contó con muestras de saliva, se empleó el paquete de extracción Oragene de DNAgenotek. El ADN se conservó en tubos eppendorf de 2 ml, con tapa de rosca a 4°C.

PROCEDIMIENTO A REALIZAR DURANTE LA TESIS

El autor del presente estudio revisó las concentraciones y calidad del ADN. Recibió adiestramiento para realizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. Se analizaron por PCR en Tiempo Real las muestras ya almacenadas de los pacientes y familiares obtenidas antes del inicio de la tesis.

La PCR en Tiempo Real

La PCR permite sacar copias de o "amplificar" algún fragmento específico dentro del genoma humano.

De esta manera, se obtienen entre cientos de miles y millones de copias del fragmento de interés, que en este caso es el polimorfismo Rs1157358. El fragmento que se copia puede tener de 50 a más de 2,000 nucleótidos de longitud. El fragmento genómico original, que sirve de molde para obtener copias, no requiere estar necesariamente aislado, sino que puede ser parte de mezclas complejas. Por ejemplo, se puede utilizar ADN nuclear total, como el que se empleó en este estudio.

El método de PCR se basa en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. La PCR inicia con una desnaturalización inicial. Esta consiste en calentar la muestra de ADN con los reactivos de PCR hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN.

Después se inician los ciclos en los que el primer paso es una desnaturalización más corta que la inicial.

En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el "apareamiento" de dos cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) que permiten flanquear el fragmento genómico que se desea amplificar. Los oligonucleótidos son segmentos de ADN de cadena simple, que en este caso fueron sintetizados por Applied Biosystems de México. Para que se pueda producir el apareamiento, los oligonucleótidos, que también se conocen como "*primers*", deben ser complementarios al segmento genómico que reconocen del ADN molde.

En tercer lugar, una enzima polimerasa de ADN permite obtener las copias nuevas de ADN en la región flanqueada por los primers. Esto se conoce como extensión. Para ello, la polimerasa usa desoxido-nucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso depende de la requerida por la polimerasa.

Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión), el tramo de ADN elegido se ha duplicado y se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. De manera sucesiva se obtienen más copias del fragmento de interés. En la PCR en Tiempo Real es un proceso más completo en el que se realiza todo en el termociclador, lo que ayuda a disminuir el riesgo de contaminación. En este tipo de PCR, al mismo tiempo que se realizan los ciclos para amplificar el fragmento del gen RORB, se obtiene información que permitirá, al final de la reacción, conocer el genotipo de cada muestra por medio de fluorescencia.

Se empleó el sistema 7500 de PCR en Tiempo Real (Applied Biosystems) y el ensayo Taqman para genotipificación de polimorfismo de un solo nucleótido C_1870633_1 (Applied Biosystems), que corresponde al polimorfismo Rs1157358 del gen RORB. Los primers estaban marcados con fluorescencia para permitir identificar los dos alelos del polimorfismo.

La reacción se llevó a cabo con un volumen total de 11µL de agua para PCR, 2.85 µL de Master Mix (que contiene nucleótidos, enzima y solución amortiguadora o *buffer*) y 0.29 µL de sonda fluorescente (primers).

Una vez que se pusieron en la placa para PCR todos los elementos para llevar a cabo la reacción, se pone una tela óptica adhesiva (Optical Adhesive Film Kit, Applied Biosystem) la cual dentro del termociclador permitía detectar los marcadores fluorescentes que proporcionarían la información acerca de amplificación a lo largo de los ciclos de la PCR.

El equipo utilizado (Applied Biosystem) permitía llevar a cabo dos programas; el primero, Discriminación alélica, el cual detecta en cada muestra las variantes que puede haber en la secuencia del nucleótido de interés; este proceso se realiza a 60 °C.

Posteriormente se programa la cuantificación absoluta en el cual se daban los cambios de temperatura: para este experimento se programó a una temperatura inicial de 50°C por 2 min, posteriormente se iniciaban los 45 ciclos de amplificación con 3 temperaturas de: 95°C X 1 min, 92°C X 0.15 min y 60°C X 1 min.

Los resultados de esta PCR se basan en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de la PCR.

Análisis de los resultados

Para el análisis de los resultados de genotipificación, se utilizó el programa FBAT (prueba de asociación basada en familias), que analiza si hay asociación alélica o genotípica, pero también si hay ligamiento genético. Con esta técnica se impiden asociaciones que simplemente se deben a estructura poblacional (diferencias étnicas entre casos y controles), ya que los alelos de los pacientes con TBP (casos) son comparados con los alelos que sus padres no les transmitieron (controles), logrando un grupo control étnicamente perfecto. En FBAT se emplea el método TDT (prueba de desequilibrio en la transmisión), en el que se comparan los alelos transmitidos con los no transmitidos y se inicia la prueba de Chi cuadrada.

En este caso se analizaron los modelos genéticos aditivo, dominante y recesivo considerando el fenotipo como:

- A) Afectado, cuando la persona presenta TBP tipo I ó II.

- B) Sano, cuando en el caso de familiares, no se presentaba ningún tipo de psicopatología de acuerdo con SCID-I.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

La sección previa a la tesis fue un estudio con riesgo mínimo. A cada uno de los pacientes y familiares se le ofreció participar voluntariamente con una previa explicación verbal de los procedimientos, objetivos, duración y las posibles ventajas del estudio.

Posteriormente se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada uno. La descripción del estudio incluyó la información sobre la confidencialidad del mismo, con la posibilidad de abandonarlo en cualquier momento, si así se deseaba y el hecho de que la atención médica no cambiaría de aceptar o no participar en la investigación. Cuando fue necesario, se otorgó un alimento a los participantes, después de la toma de muestra sanguínea.

Se aplicaron entrevista diagnóstica y cuestionarios, se registraron medidas corporales, tensión arterial, talla y peso. También se tomó una muestra de sangre (de 5 a 10 ml) por participante. En caso de que no se identificara una vena apropiada para llevar a cabo la punción o que el individuo no deseara donar una muestra sanguínea, se le proponía donar una muestra de saliva. A aquellos sujetos que tuvieron molestias a causa de la punción, se les dio seguimiento médico para evitar posibles complicaciones. En todo momento se utilizaron materiales nuevos y completamente estériles y las punciones fueron realizadas por personal con amplia experiencia en la punción venosa. Por otro lado, si en la entrevista se tocaba algún tema delicado que provocó algún malestar en el participante, se interrumpió inmediatamente la entrevista y posteriormente se le ofreció atención psiquiátrica.

El proyecto de tesis por sí mismo fue una investigación sin riesgo, ya que solamente se trabajó con muestras de ADN y códigos en la base de datos y nunca se trabajó con datos personales de los participantes.

RESULTADOS

Se analizó una muestra total de 269 personas. De ellas, 115 son pacientes y 154 familiares de primer grado.

Se contó con información de 115 familias que incluyen 117 familias nucleares, esto quiere decir que en dos familias se encontraban 2 familias nucleares.

De los 115 pacientes, 89 presentan TBP-I (77.3%) y el resto TBP-II. De ellos 36 son hombres, con una edad promedio de 32.1 años. Las 79 mujeres tienen una edad promedio de 41.9 años.

Como se muestra en la figura 1, gran parte de los pacientes tienen alteraciones en el sueño (72%), de los cuales el 56.6% padecen insomnio y el 43.4% hipersomnias, mientras que el 28% de los pacientes no presentan alteraciones en el sueño.

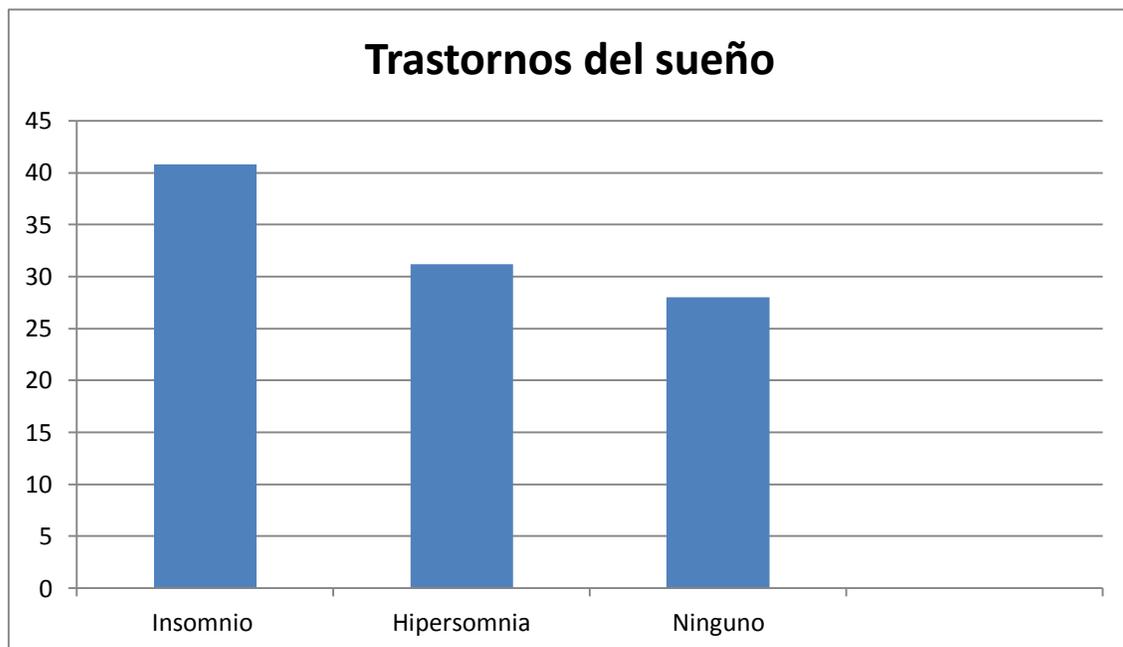


Figura 1. Alteraciones del sueño en los 115 pacientes estudiados, expresado en porcentaje.

Se utilizó el programa FBAT 202C para Windows y se muestran los resultados para el modelo aditivo para prueba bialélica. Se obtuvo una frecuencia del alelo 1 de 0.34% y del alelo 2 del 0.65%.

Se obtuvieron genotipos para todas las muestras incluidas en tres placas en las que se puede apreciar que el alelo 2 es más frecuente (figuras 2 a 4).

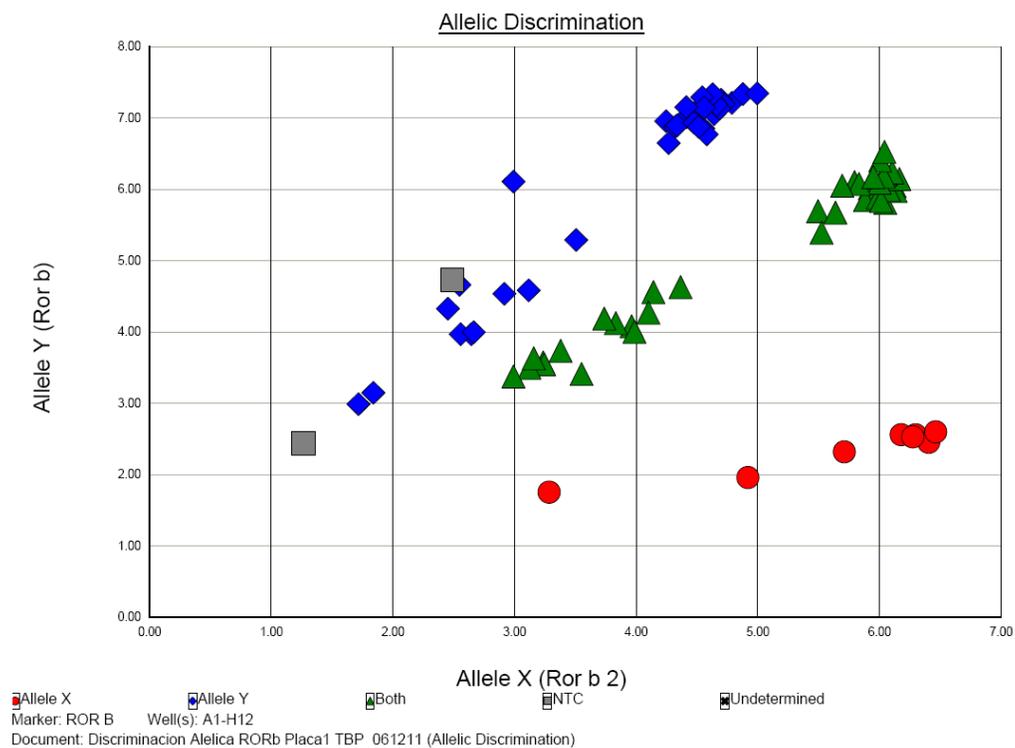


Figura 2. Placa no. 1, discriminación alélica del polimorfismo rs1157358 del gen RORb. En círculos se presentan las muestras con genotipo 11, en triángulos las muestras con genotipo 12 y en rombos las muestras con genotipos 22. En cuadrados los controles negativos.

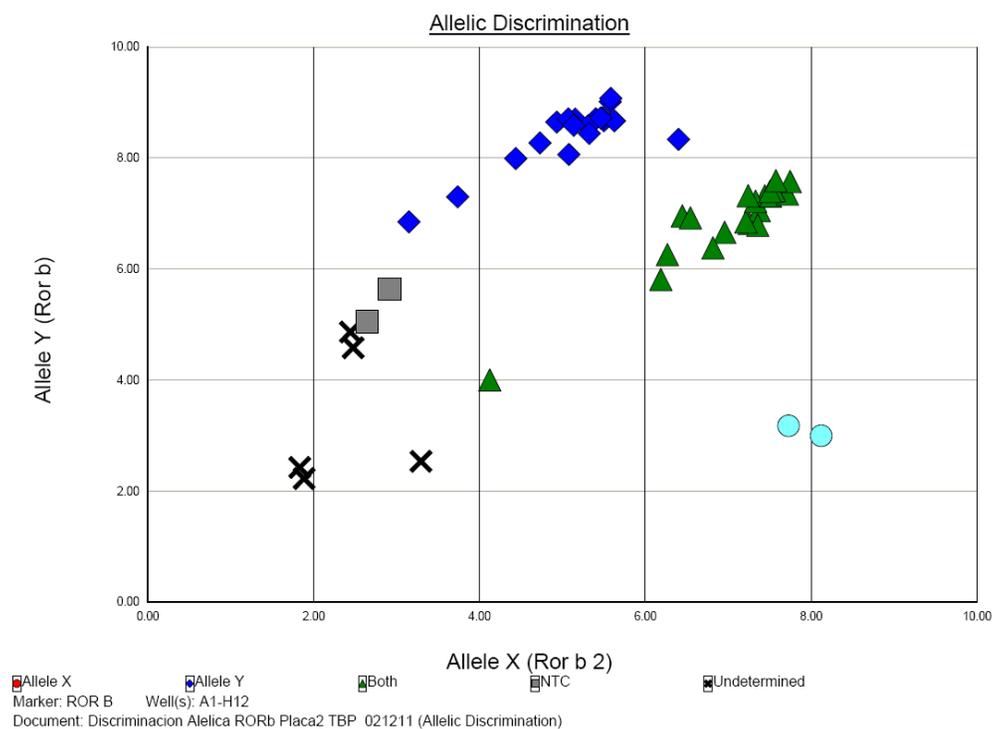


Figura 3. Placa no 2, discriminación alélica del polimorfismo rs1157358 del gen RORb. En círculos se presentan las muestras con genotipo 11, en triángulos las muestras con genotipo 12 y en rombos las muestras con genotipos 22. En cuadrados los controles negativos. En cruces se presentan las muestras que no amplificaron (5).

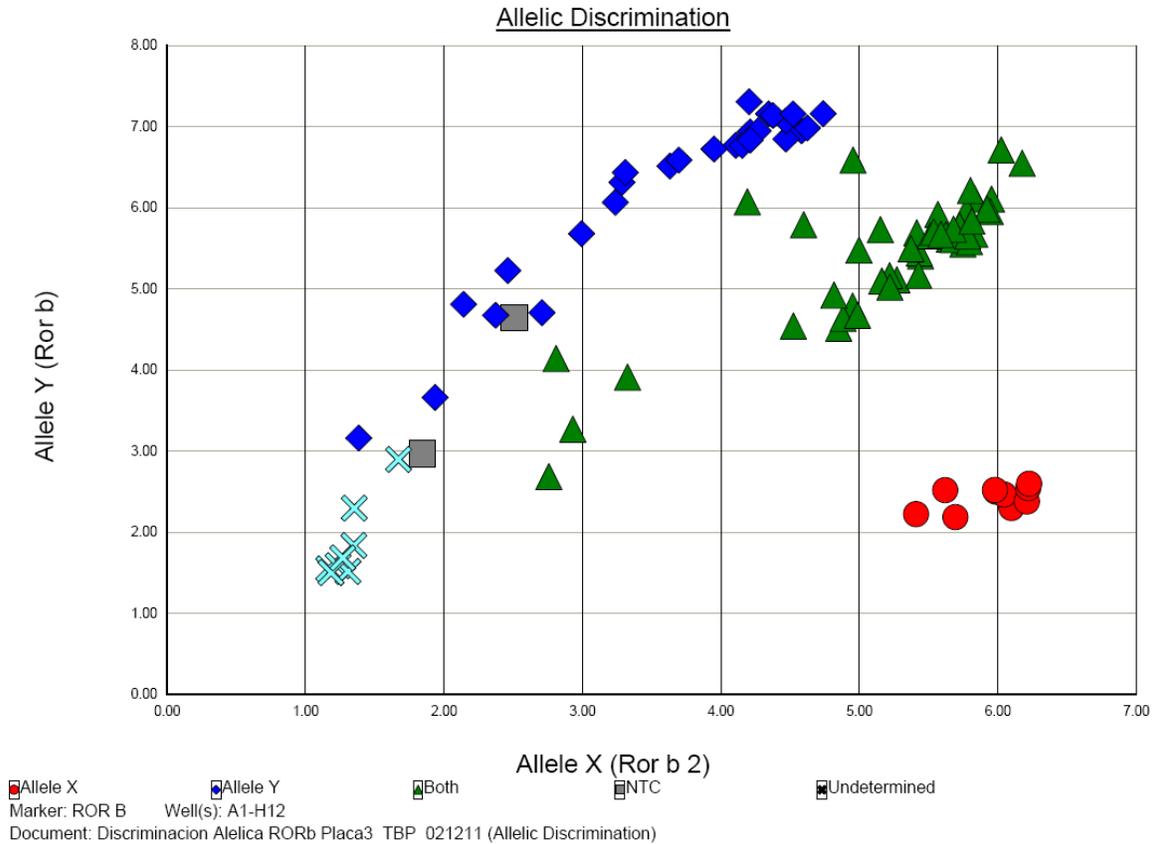


Figura 4. Placa no 3, discriminación alélica del polimorfismo rs1157358 del gen RORb. En círculos se presentan las muestras con genotipo 11, en triángulos las muestras con genotipo 12 y en rombos las muestras con genotipos 22. En cuadrados los controles negativos. En cruces se presentan las muestras que no amplificaron (8).

No se detectó asociación entre TBP I y II y el polimorfismo analizado. Como se indicó anteriormente, ambos alelos (1 y 2) son frecuentes pero ninguno se asocia con enfermedad.

En algunos casos uno de los controles negativos aparecía con valores de fluorescencia similares a las muestras.

Esto se puede deber a contaminación por lo que se repitieron hasta en 5 ocasiones los ensayos y se detectó que se trataba de una falla general del polimorfismo. El termociclador fue revisado y se comprobó que no había contaminación.

DISCUSIÓN

Se ha sugerido en algunos estudios previos que genes relacionados con el ciclo circadiano, en particular RORB, podría estar ampliamente relacionado con la etiología del TBP. Se han encontrado evidencias de asociación entre el gen RORB y TBP infantil. Estos hallazgos proceden de un estudio genético de 152 niños que tenían TBP y de 140 niños sin el trastorno.

En el presente estudio, se buscó determinar si existe asociación entre el polimorfismo rs1157358 del gen RORB y el TBP I y II en pacientes adultos.

Se analizó una muestra total de 269 personas. De ellas, 115 eran pacientes y 154 familiares de primer grado. Un poco más de tres cuartas partes de los pacientes tenían TBP-I y el resto TBP-II. De ellos 36 fueron hombres, con una edad promedio de 32.1 años y 79 mujeres con edad promedio de 41.9 años.

En general se contó con una buena calidad de DNA pero en pocas muestras se detectó contaminación probablemente con hemoglobina que provenía de la extracción del ADN a partir de sangre. En algunas muestras se encontró muy poca cantidad de DNA por lo que no se pudieron tipificar.

La cantidad de DNA aislado de una muestra de sangre es altamente dependiente del número de glóbulos blancos presentes en la muestra y las condiciones de almacenamiento de la sangre. Las principales causas de leucopenia son secundarias a infecciones virales o trastornos congénitos de la médula ósea, cáncer y trastornos autoinmunes.

Ciertos fármacos como la clozapina, otros antipsicóticos e inmunosupresores también pueden causar disminución de la cuenta leucocitaria, aunque la mayoría de las veces es temporal.

Los estudios de asociación genética basados en familias han sido exitosos para encontrar alelos que confieren un riesgo a enfermedades complejas y tienen la ventaja de proporcionar un control étnico adecuado. En general, el objetivo de estos estudios es evaluar si alguna de las variantes genéticas, que en este estudio fueron los alelos 1 ó 2, se transmitieron más de lo esperado a los pacientes con TBP.

Entre las fortalezas de los estudios de asociación basados en familias se encuentra que al seleccionar a las familias por tener integrantes afectados, estos aportan mayor información sobre enfermedades hereditarias y sobre la prevalencia de la enfermedad en un subgrupo de familiares. Además, al utilizarse controles de la misma familia, no hay riesgo de confusión por estratificación poblacional.

Entre las debilidades se puede dar una participación incompleta de los integrantes de la familia, dado que no siempre hay disponibilidad de padres controles o abuelos cuando la enfermedad es de aparición tardía, suelen ser menos eficientes para el estudio de polimorfismos de baja penetrancia o pueden presentar sobrepareamiento por utilizar controles familiares. Adicionalmente, debido a que los datos y mediciones obtenidos de los integrantes de una familia no son independientes, requieren la aplicación de métodos estadísticos especiales para el análisis, pueden no ser efectivos en la detección de interacciones ambientales cuando los polimorfismos o factores de riesgo ambientales son de baja frecuencia (dependen del tamaño de muestra), no representan a la población en riesgo y los resultados solo son extrapolables a las familias estudiadas.

Otra de las desventajas de este tipo de estudios es que requiere de información de padres heterocigotos y por lo tanto disminuye así las familias de estudio.

En este estudio solo había 24 familias informativas, esto quiere decir con padres heterocigotos.

CONCLUSIONES

No se encontró asociación entre polimorfismo rs1157358 y trastorno bipolar en sus dos variantes, se logró con el diseño de este estudio tener la ventaja de permitir un control étnicamente perfecto, y obtener frecuencias en esta población para posteriormente ser comparadas con otras poblaciones.

Debido a que este tipo de estudio se ha realizado únicamente en población infantil es necesario realizarlo en población mexicana de las mismas características para realizar comparación de resultados.

CRONOGRAMA

20 de septiembre de 2010	Entrega de anteproyecto.
10 de diciembre de 2010	Entrega de protocolo definitivo.
A partir de que el protocolo sea aceptado	Aprobación por el comité de tesis.
Del 1ero de marzo del 2011 al 1 de junio del 2011	Se llevará a cabo la capacitación para realización de PCR, electroforesis y genotipificación.
17 de junio de 2011	Primer avance de la tesis
20 de junio del 2011 al 20 de septiembre del 2011	Realización de PCR aplicando la técnica para identificar el polimorfismo rs1157358 del gen Rorb.
28 de septiembre de 2011	Segundo avance de la tesis
30 de septiembre del 2011 al 30 de noviembre del 2011	Análisis de resultados con programa estadístico FBAT, y redacción de resultados
4 de diciembre de 2011	Tercer avance de la tesis
10 de diciembre del 2011 al 15 de febrero del 2012	Redacción de resultados y conclusiones
2 de marzo de 2012	Cuarto avance de la tesis
30 de marzo de 2012	Entrega de tesis terminada

Referencias Bibliográficas:

1. Holmgren, D., Lermenda, V., *Family disruption in bipolar disorder*. Rev Chil Neuro-Psiquiat 2005; 43(4): 275-286.
2. Akiskal, H. *Validating "hard" and "soft" phenotypes within the bipolar spectrum: continuity or discontinuity?* J Affect Disord 2003; 73:1-5.
3. American Psychiatric Association. DSM-IV-TR. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. American Psychiatry Association. Barcelona: Masson; 2002.

4. Biederman J, Faraone S, Wozniak J, Mick E, Kwon A, Cayton G, Clark S. Clinical correlates of bipolar disorder in a large, referred sample of children and adolescents. *J Psychiatr Res.* 2005;39:611–622.
5. Gaspar, E., Calati, R., *Depressive symptomatology is influenced by chronotypes.* Journal of Affective Disorders 119 (2009) 100–106.
6. Potash, J., Toolan, J. *The Bipolar Disorder Phenome Database: A Resource for Genetic Studies.* Am J Psychiatry 2007; 164:1229–1237).
7. Andre, E., Conquet, F., *Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice.* EMBO J. vol. 17, 3867-3877, 1998.
8. Jetten A, Kurebayashi S, Ueda E. The ROR nuclear orphan receptor subfamily: Critical regulators of multiple biological processes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;69:205–247.
9. Vieta E, *Nuevos horizontes en la investigación sobre los trastornos bipolares.* Interpsiquis, 2007, Barcelona, Cataluña, España.
10. Luckenbaugh DA, Findling RL, Leverich GS, Pizzarello SM, Post RM. Earliest symptoms discriminating juvenile-onset bipolar illness from ADHD. *Bipolar Disorders.* 2009;11:441–451.
11. Ospina D, Genetic loci associated to bipolar disorder. rev. colomb. psiquiatr. Vol. 30 No. 3 Bogotá July/Sept. 2001.
12. McGrath CL, Glatt SJ, *Evidence for genetic association of RORB with bipolar disorder.* Department of Psychiatry, Laboratory of Neurophenomics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA.
13. Niculescu A, Segal D, Kuczenski R, Barrett T, Hauger R, Kelsoe J. Identifying a series of candidate genes for mania and psychosis: a convergent functional genomics approach. *Physiol Genomics.* 2000;4(1):83–91.
14. Wager-Smith K, Kay S. Circadian rhythm genetics: from flies to mice to humans. *Nat Genet.* 2000;26(1):23–27.
15. Niculescu A, Kelsoe J. Convergent functional genomics: application to bipolar disorder. *Ann Med.* 2001;33(4):263–271.
16. Kelsoe J, Niculescu A. Finding genes for bipolar disorder in the functional genomics era: from convergent functional genomics to phenomics and back. *CNS Spectr.* 2002.
17. Lenox R, Gould T, Manji H. Endophenotypes in bipolar disorder. *Am J Med Genet B.* 2002;114(4):391–406.
18. Hasler G, Drevets W, Gould T, Gottesman I, Manji H. Toward constructing an endophenotype strategy for bipolar disorders. *Biol Psychiatry.* 2006;60(2):93–105.
19. Wirz-Justice A. Biological rhythm disturbances in mood disorders. *Int Clin Psychopharmacol.* 2006;21(Suppl 1):S11–S15.

20. McClung C. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. *Pharmacol Ther.* 2007;114(2):222–232.
21. Le-Niculescu H, McFarland M, Ogden C, Balaraman Y, Patel S, Tan J, Rodd Z, Paulus M, Geyer M, Edenberg H. Phenomic, convergent functional genomic, and biomarker studies in a stress-reactive genetic animal model of bipolar disorder and co-morbid alcoholism. *Am J Med Genet B.* 2008;147B(2):134–166.
22. Johansson C, Willeit M, Smedh C, Ekholm J, Paunio T, Kieseppa T, Lichtermann D, Praschak-Rieder N, Neumeister A, Nilsson LG. Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28(4):734–739.
23. Partonen T, Treutlein J, Alpmann A, Frank J, Johansson C, Depner M, Aron L, Rietschel M, Wellek S, Soronen P. Three circadian clock genes *Per2*, *Arntl*, and *Npas2* contribute to winter depression. *Ann Med.* 2007;39(3):229–238.
24. Ogden CA, Rich ME, Schork NJ, Paulus MP, Geyer MA, Lohr JB, Kuczenski R, Niculescu AB. Candidate genes, pathways and mechanisms for bipolar (manic-depressive) and related disorders: an expanded convergent functional genomics approach. *Mol Psychiatry.* 2004;9(11):1007–1029.
25. Mansour HA, Wood J, Logue T, Chowdari KV, Dayal M, Kupfer DJ, Monk TH, Devlin B, Nimgaonkar VL. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 2006;5(2):150–157.
26. Nievergelt CM, Kripke DF, Barrett TB, Burg E, Remick RA, Sadovnick AD, McElroy SL, Keck PE Jr, Schork NJ, Kelsoe JR. Suggestive evidence for association of the circadian genes *PERIOD3* and *ARNTL* with bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006;141(3):234–241.
27. Ripperger JA, Schibler U. Rhythmic *CLOCK*-*BMAL1* binding to multiple E-box motifs drives circadian *Dbp* transcription and chromatin transitions. *Nat Genet.* 2006;38(3):369–374.
28. Yang X, Downes M, Yu R, Bookout A, He W, Straume M, Mangelsdorf D, Evans R. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell.* 2006;126(4):801–810.
29. Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor *RORA* regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *BMAL1*. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12:441–448.
30. Frederic F, Chianale C, Oliver C, Mariani J. Enhanced endocrine response to novel environment stress and lack of corticosterone circadian rhythm in staggerer (*Rora* sg/sg) mutant mice. *J Neurosci Res.* 2006;83(8):1525–1532.
31. Arana GW, Wilens TE, Baldessarini RJ. Plasma corticosterone and cortisol following dexamethasone in psychiatric patients. *Psychoneuroendocrinology.* 1985;10(1):49–60.
32. Jetten A, Ueda E. Retinoid-related orphan receptors (RORs): roles in cell survival, differentiation and disease. *Cell Death Differ.* 2002; 9:1167–1171.

33. Veen DR van der, Minh NL, Gos P, Arneric M, Gerkema MP, Schibler U. Impact of behavior on central and peripheral circadian clocks in the common vole *Microtus arvalis*, a mammal with ultradian rhythms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(9):3393–3398.
34. Jetten A, Kurebayashi S, Ueda E. The ROR nuclear orphan receptor subfamily: Critical regulators of multiple biological processes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;69:205–247.
35. Bunney W, Bunney B. Molecular clock genes in man and lower animals: Possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22(4):335–345.
36. Harvey, A. *Sleep and Circadian Rhythms in Bipolar Disorder: Seeking Synchrony, Harmony, and Regulation*. *Am J Psychiatry* 2008; 165:820–829.